АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

# МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XX. ВЫП. 4.

ИЮЛЬ — АВГУСТ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1951

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

Редактор чл.-корр. АН СССР А. А. Имшенецкий

Секретарь Я. И. Раутенштейн

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Н. Д. Иерусалимский, Н. А. Красильников,
Е. Н. Мишустин, К. И. Рудаков, М. В. Федоров, В. Н. Шапошников

*ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ «МИКРОБИОЛОГИЯ»*
*ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2*
*КОНТОРА «АКАДЕМКНИГА»*

---

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакция журнала «Микробиология»

# РОЛЬ ВИТАМИНА $B_1$ И ПАРА-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ RHODOTORULA AURANTIACA

*Г. А. Медведева*

Для большинства бактерий пара-аминобензойная кислота является необходимым витамином. Некоторые из бактерий, не способные синтезировать этот витамин, были предложены в качестве индикаторов для определения пара-аминобензойной кислоты. К их числу принадлежат Clostridium acetobutylicum, Streptobacterium plantarum, Streptococcus haemoliticus, Brucella abortus и многие другие (Иерусалимский [1, 2, 3, 4, 5]; Peterson W. u. Peterson H. [19]; Snell [23]). Известен также ряд бактерий, которые способны синтезировать пара-аминобензойную кислоту в довольно значительных количествах. Такими микроорганизмами являются многие виды Staphylococcus, Streptococcus, Corynebacterium, Mycobacterium, Proteus, Escherichia.

Способность синтезировать пара-аминобензойную кислоту может быть утрачена под влиянием тех или иных воздействий или условий культивирования, и тогда организм становится зависимым от внешнего снабжения этим веществом. Такая утрата была описана Lampen с сотр. [17] у Escherichia coli.

В то время как среди бактерий довольно часто встречаются формы ауксо-гетеротрофные в отношении пара-аминобензойной кислоты, т. е. нуждающиеся в ее получении извне, большинство дрожжевых и мицелиальных грибов способно этот витамин синтезировать и накапливать как в питательной среде, так и в самих клетках. Как известно, пара-аминобензойная кислота была выделена из дрожжей в весьма значительных количествах (Rubbo a. Gillespie [22]). Только единичные виды оказались зависящими от внешнего снабжения этим веществом. К ним в первую очередь принадлежит Rhodotorula aurantiaca из группы так называемых розовых дрожжеподобных организмов, содержащих каротиноидные пигменты.

По нашим исследованиям, пара-аминобензойная кислота значительно влияет на морфологический облик и функциональное состояние некоторых дрожжевых организмов (например, Torulopsis pulcherrima), не вызывая у них, однако, заметного активирования размножения.

В 1943 г. Мейсель обнаружил благоприятное влияние пара-аминобензойной кислоты на образование и устойчивость каротиноидных пигментов у дрожжей. В том же году нами была выяснена потребность Rh. aurantiaca в пара-аминобензойной кислоте как в необходимом витамине. Эти данные были приведены в развернутом виде в нашей диссертационной работе (Медведева [6]).

В 1944 г. появилась краткая заметка Robbins и Ma [21], также обнаруживших, что Rh. aurantiaca нуждается в получении извне пара-аминобензойной кислоты, которая проявляет свое действие только в комбинации с витамином $B_1$. Недавно Rainbow [20] сообщил, что им выделены из производственных культур пивных дрожжей два штамма, требующих для своего развития на сахаро-минеральной среде прибавления пара-аминобензойной кислоты в количестве 0,01 μг на 1 мл. Дрожжи им не были определены, а лишь обозначены как № 45 и № 47. Дрожжи № 45, по данным автора, хорошо развиваются в присутствии пара-аминобензойной кислоты и биотина, хотя добавление пантотеновой кислоты и -аланина по фону указанных веществ значительно стимулирует рост. Дрожжи № 47 требуют пара-аминобензойной кислоты, биотина и пантотеновой кислоты, в то время как добавление инозита, рибофлавина, анейрина, никотиновой кислоты и пиридоксина оказывает стимулирующее действие на рост этих дрожжей.

Этим собственно и исчерпываются литературные данные об организмах, требующих для своего нормального развития наличия в среде пара-аминобензойной кислоты.

Пара-аминобензойная кислота привлекла общее внимание как вещество, конкурирующее с сульфамидами и снимающее их действие, угнетающее размножение микробов. Исследование этого взаимодействия привело к разработке интересной гипотезы, объясняющей механизм действия сульфамидов конкуренцией их с необходимым для жизни клетки метаболитом, пара-аминобензойной кислотой (Woods

a. Fildes [24]). По их гипотезе ингибиторы должны быть сходными по химической структуре с метаболитами. Между метаболитами и ингибиторами происходит борьба за место в энзиматической системе, так как и те и другие имеют одинаковую точку приложения: ингибиторы блокируют энзиматические системы бактерий, вызывая их инактивирование, метаболиты же, наоборот, активируют те или иные стороны клеточной жизнедеятельности.

Гипотеза Woods и Fildes [24] послужила началом для исследования пара-аминобензойной кислоты как витамина, а сульфамидов как антивитаминов.

Физиологическая роль пара-аминобензойной кислоты не может считаться выясненной. Наиболее вероятной кажется ее связь с образованием в клетках микробов фолиевой (птероил-глутаминовой) кислоты, в состав молекулы которой она входит.

Однако, по нашим наблюдениям и литературным данным, фолиевая кислота в ряде случаев оказывается менее активной, чем пара-аминобензойная кислота. Более того, оказалось, что один из вариантов кишечной палочки, нуждающейся в доставке пара-аминобензойной кислоты вообще, не мог использовать вместо этого вещества птероил-глутаминовую кислоту.

Cutts и Rainbow [13], используя дрожжевой тест-организм (№ 47) на пара-аминобензойную кислоту, показали, что последняя может быть заменена относительно бо́льшими количествами (20 μг на 1 мл) аденина, метионина и гистидина, взятыми по фону всех необходимых аминокислот или безвитаминного казеин-гидролизата. Отсюда авторы делают вывод об участии пара-аминобензойной кислоты в синтезе этих веществ, что вполне согласуется с более ранними работами (Kohn и Harris [15, 16]).

Имеются указания на участие пара-аминобензойной кислоты в образовании пигментов, в том числе и меланинов, у животных и микроорганизмов (Ansbacher [10]). В присутствии пара-аминобензойной кислоты усиливается образование пигмента некоторыми бактериями (Mayer [18]) грибами (Cushind a. Reid [12]) и наблюдается большая устойчивость каротиноидных пигментов (Мейсель [8]).

По данным некоторых авторов (Giese u. Tatum [14]), пара-аминобензойная кислота связана с дыхательными энзимами, повышая интенсивность поглощения кислорода у полученного ими «беспарааминобензойного» штамма Neurospora crassa.

Cook и Walch [11], напротив, отмечают угнетение дыхания у микроорганизмов под влиянием пара-аминобензойной кислоты.

Эти противоречия, повидимому, связаны с тем, что исследователи применяли различные концентрации пара-аминобензойной кислоты.

Таким образом, несмотря на то, что пара-аминобензойная кислота воздействует на весьма разнообразные процессы клеточного обмена, вопрос о ее конкретной физиологической роли и точках приложения остается открытым.

## Объекты и методы исследования

Нами были исследованы дрожжеподобные организмы сем. Rhodotorulaceae и Sporobolomycetaceae, культивировавшиеся на сахаро-минеральной среде Ридер, в которой в качестве источника азота служил либо сернокислый аммоний, либо гидролизат казеина, освобожденный от витаминов. Последние прибавлялись к среде в различных комбинациях. Реакция указанных организмов на те или иные витамины представлена в табл. 1.

Засев культур производился суспензией, содержащей 3—5 тысяч клеток в 1 мл.

Двухсуточные культуры исследовались цитологически при помощи прижизненной окраски нейтральным красным и зеленым янусом, а также посредством фиксации парами формалина и последующей окраски железным гематоксилином. Урожай дрожжей определялся весовым способом или нефелометрически.

Интенсивность поглощения культурами кислорода изучалась в аппарате Варбурга. Опыты велись при температуре 25—28° продолжительностью 2—3 часа. Общий объем жидкости в сосудах 5 мл, конечная концентрация дрожжей 0,75% (по весу прессованных дрожжей), концентрация сахарозы 1,2%. Коэффициент интенсивности поглощения кислорода выражался в $Q_{O2}$, что означает количество поглощенного кислорода в 1 мм³ за единицу времени на 1 г сухого вещества.

## Экспериментальные данные

Для большинства исследованных нами представителей Rhodotorulaceae основным требуемым извне витамином оказался витамин $B_1$ или

его составные части. Некоторые из видов Rhodotorula совсем не нуждаются в добавлении к среде витаминов, так как способны их синтезировать (Медведева [6]). Только для Rh. aurantiaca, кроме витамина $B_1$, необходимо присутствие в среде второго витамина — пара-аминобензойной кислоты.

По нашим наблюдениям, способность реагировать на пара-аминобензойную кислоту весьма характерна для вида Rh. aurantiaca и может служить одним из признаков для его идентификации. Опыты показали, что пара-аминобензойная кислота не заменяется другими, даже очень

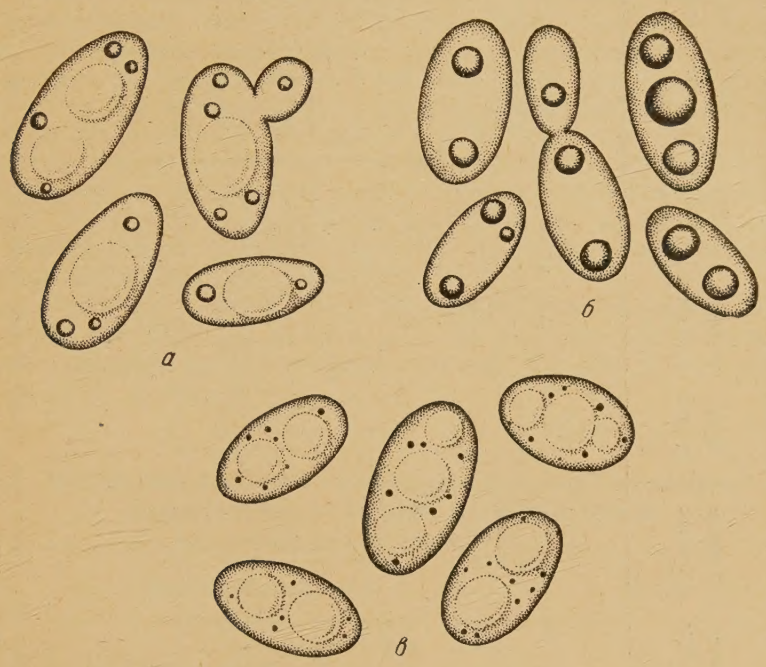



Рис. 1. Реакция клеток Rhodotorula aurantiaca на присутствие в среде витамина $B_1$ и пара-аминобензойной кислоты.

*а* — на сахаро-минеральной среде без витаминов; *б* — то же + витамин $B_1$; *в* — то же + витамин $B_1$ + пара-аминобензойная кислота

близкими соединениями. Родственная пара-аминобензойной кислоте антраниловая кислота, отличающаяся от первой только положением аминогруппы, не оказалась в наших опытах способной заменить пара-аминобензойную кислоту.

Будучи прибавлена, наряду с витамином $B_1$, к питательной среде, антраниловая кислота не оказала сколько-нибудь заметного действия ни на размножение и пигментирование, ни на функционально-морфологическое состояние культуры.

Фолиевая кислота может частично заменять пара-аминобензойную кислоту [7].

Весьма интересно влияние витамина $B_1$ и пара-аминобензойной кислоты на функционально-морфологический облик клетки. Если в среде Ридер имеется только витамин $B_1$ (2 мкг в 1 мл), клетки оказываются наполненными большими каплями жира. Прибавление сюда же дополнительно пара-аминобензойной кислоты (0,02 мкг в 1 мл) полностью снимает эту жировую реакцию (рис. 1). Характерно, что при этом общая окраска культуры, зависящая от каротиноидных пигментов, не ослабляется. Этот факт противоречит распространенному представлению о связи между жиронакоплением и увеличением содержания каротиноидов. В наших опытах такая связь не подтвердилась.

Таблица 1

**Реакция каротиноидных организмов на добавление витаминов извне**

| Культура | Минус $B_1$ | Минус $B_2$ | Минус $B_6$ | Минус биотин | Минус PaBa | Минус инозит | Минус никотин | Минус пантотен | Минус фолиевая к-та | Минус дрожж. нукл. | Минус гетероауксин | Все витамины | Все витамины + дрожжевой автолизат |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rhodotorula aurantiaca y-I ATCC . . | + | +++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh.aurantiaca 9536. ATCC | + | +++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. aurea CBS . . . . | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. flava CBS . . . . | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. glutinis ИНМИ . | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. glutinis 2527 ATCC . . . . . | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. glutinis CBS . . . | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. mucilaginosa . . . | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. mucilaginosa var. sanguinea . . . . . | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. rosea ИНМИ . . . | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. rufula ИНМИ . . . | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. rubra ВАСХНИЛ | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Rh. rubra CBS . . . . | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Sporobolomyces roseus . . . . . | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

Примечание. Фолиевая кислота необходима для развития Rh. aurantiaca только в том случае, когда в среде отсутствует пара-аминобензойная кислота. + рост культуры очень слабый, практически можно говорить об отсутствии роста; ++ рост слабый; +++ очень интенсивное развитие культуры, ничем не отличающееся от развития на сусло-агаре. ИНМИ — Институт микробиологии Академии Наук СССР; ВАСХНИЛ — Музей института микробиологии Академии сельского хозяйства, Ленинград; CBS — Central bureau voor Schimmelcultures, Baarn; ATCC — American Type Cultures Collection.

В какой мере пара-аминобензойная кислота непосредственно влияет на образование каротиноидов, предстоит выяснить в дальнейшем.

Ни одно из испытанных нами других активирующих рост веществ, прибавленных либо вместо витамина $B_1$, либо вместо пара-аминобензойной кислоты, не дало никакого эффекта. Биотин, пантотеновая и никотиновая кислоты, витамин $B_6$, инозит, витамин $B_2$ и гетероауксин не способны существенно изменить определяющего воздействия основных для развития Rh. aurantiaca витаминов: витамина $B_1$ и пара-аминобензойной кислоты.

На примере Rh. aurantiaca особенно отчетливо выступает как взаимодополняющее, так и взаиморегулирующее действие витаминов.

Если в отношении активирования роста и размножения данного организма витамин $B_1$ и пара-аминобензойная кислота дополняют друг друга и действуют в одном направлении, то в процессах образования и накопления жира эти витамины оказывают противоположное влияние.

Возможно, что в отсутствие пара-аминобензойной кислоты и при наличии витамина $B_1$ происходит сдвиг в окислительно-восстановительных процессах, что в свою очередь ведет к накоплению жира. Это предположение подкрепляется нашими опытами по выяснению интенсивности поглощения кислорода Rh. aurantiaca.

Опыты показали, что культура Rh. aurantiaca, выросшая в присутствии одного витамина $B_1$, поглощает в два раза меньше кислорода, чем такая же культура, но получившая, помимо $B_1$, еще и пара-аминобензойную кислоту (табл. 2).

Таблица 2

**Поглощение кислорода культурами Rhodotorula aurantiaca в зависимости от условий культивирования**

| Условия культивирования | $Q_{O_2}$ | Урожай с 10 чашек в г |
|---|---|---|
| Среда Ридер + витамин $B_1$ . . . . . | 22,6 | 0,3 |
| Среда Ридер + витамин $B_1$ + пара-аминобензойная кислота . . . . . | 46,2 | 2,1 |
| Сусло-агар . . . . . | 43,3 | 2,6 |

Приведенные данные убеждают в том, что витамин $B_1$ совместно с пара-аминобензойной кислотой создает на искусственной сахаро-минеральной среде напряженность окислительных процессов, почти совпадающую с той, какая наблюдается у Rh. aurantiaca на естественной питательной среде. Отсутствие пара-аминобензойной кислоты резко снижает поглощение кислорода культурой.

Клетки, исследованные физиологически, были изучены нами и цитологически.

При развитии на среде Ридер без витаминов или в присутствии одной пара-аминобензойной кислоты клетки имеют крупные ядра, хондриозомы в виде то более мелких, то более крупных зернистых образований. Следует отметить, что при наличии в среде одной пара-аминобензойной кислоты протопласт клеток очень прочно связывается с красками, вследствие чего трудно и плохо дифференцируются ядерный и хондриозомный аппараты .Это, без сомнения, указывает на какие-то изменения в химическом составе или физико-химическом состоянии основных компонентов клетки (рис. 2, *а*).

При наличии в среде одновременно обоих необходимых витаминов клетки содержат небольшие делящиеся ядра и хондриозомный аппарат

в виде тонких нитей, образующих причудливые сплетения. Нити имеют тенденцию распадаться на зерна. В клетках из таких культур мы

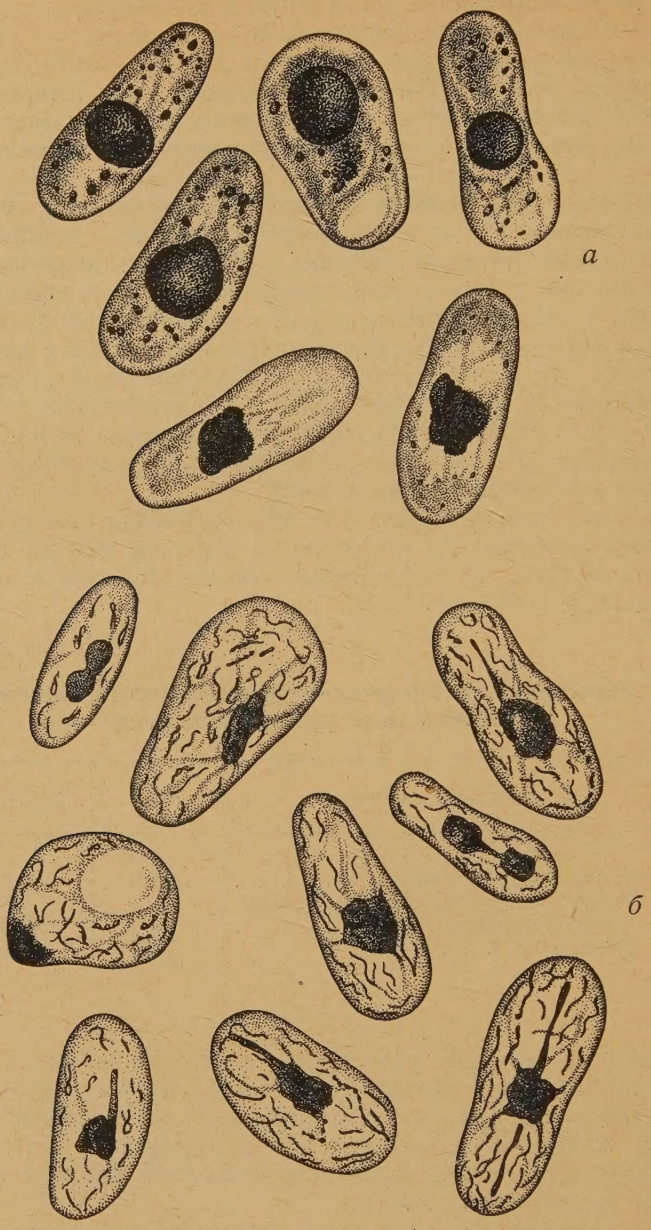



Рис. 2. Влияние пара-аминобензойной кислоты и витамина $B_1$ на тонкую структуру клеток Rhodotorula aurantiaca.

*а* — на сахаро-минеральной среде + пара-аминобензойной кислоте и *б* — то же + витамин $B_1$

неоднократно наблюдали своеобразные структуры, отсутствовавшие при других условиях культивирования. Эти структуры представляют собой палочковидные образования, возникающие в ядре, вытягивающиеся из ядра в протоплазму и затем после отделения от ядра свободно лежащие в плазме.

Эти структуры до некоторой степени напоминают «хромидии» старых цитологов, хотя вряд ли идентичны с ними. Во всяком случае наличие

таких палочковидных структур мы наблюдали только в клетках Rh. aurantiaca, развивающихся на среде с витамином $B_1$ и пара-аминобензойной кислотой (рис. 2, *б*).

Функционально-морфологическая реакция клеток Rh. aurantiaca на витамин $B_1$ и пара-аминобензойную кислоту может быть использована для определения этих витаминов.

Представлялось поэтому существенным выяснить минимальные концентрации пара-аминобензойной кислоты, которые еще в состоянии взаимодействовать с витамином $B_1$ как в отношении ростовой, так и морфологической реакции клеток. Для этой цели на фоне одной и той же концентрации витамина $B_1$ (10 μг в 1 мл) к среде прибавлялись различные количества пара-аминобензойной кислоты (от 5—$10^{-7}$ μг до 20 μг на 1 мл). При концентрации пара-аминобензойной кислоты $5 \cdot 10^{-7}$ μг и $5 \cdot 10^{-6}$ μг на 1 мл ни заметного активирования, ни устранения морфологических изменений, вызванных действием витамина $B_1$, не наблюдается. Между концентрациями $5 \cdot 10^{-5}$ μг и $5 \cdot 10^{-4}$ μг в 1 мл лежит порог действия пара-аминобензойной кислоты. При этом очень отчетливо выступают морфологические изменения клетки. Жир, накапливающийся в больших количествах в клетках при наличии в среде одного витамина $B_1$ и не устраняемый малыми концентрациями пара-аминобензойной кислоты, исчезает, как только количества этой кислоты достигают $5 \cdot 10^{-3}$ μг в 1 мл. Клетки из удлиненно-овальных становятся более округлыми и образуют почки, зачастую неправильной формы.

Протоплазма, освободившаяся от жира, приобретает мелкогранулярный характер; в ней отчетливо выступают вакуоли. Избыток пара-аминобензойной кислоты (20 μг в 1 мл и выше) действует на клетки культуры токсически, вызывая дегенеративные изменения.

При концентрациях пара-аминобензойной кислоты от 0,5 до 10 μг в 1 мл, когда наблюдается отчетливое влияние ее на процесс размножения и пигментообразования Rh. aurantiaca, так же как и на морфологическое состояние клеток, с возрастом культуры происходят резкие изменения. Клетки приобретают необычную форму, дегенерируют и лизируются, хотя макроскопический вид культуры не представляет существенного отклонения от нормального ни по нарастанию массы, ни по интенсивности окраски пигмента.

### Защитная роль пара-аминобензойной кислоты

Как уже отмечалось, Мейсель в 1943 г. наблюдал повышение устойчивости каротиноидных пигментов в присутствии пара-аминобензойной кислоты. Мы изучили более подробно это явление. Можно было отметить, что во всех случаях, когда среда содержала эту кислоту, каротиноидные пигменты оказывались более устойчивыми к окислению и обесцвечиванию. Даже, повидимому, на полноценных искусственных средах, содержащих, помимо всех необходимых компонентов, еще и гидролизат казеина (лишенный витаминов), и на таких же средах, снабженных витамином $B_1$, довольно быстро наступает обесцвечивание образовавшегося в культурах каротиноидного пигмента. Это обесцвечивание приводит к тому, что культуры в течение сравнительно короткого времени из красных или розовых становятся белыми. Этому обесцвечиванию противодействует пара-аминобензойная кислота.

Концентрация пара-аминобензойной кислоты 0,5 μг в 1 мл еще не может противостоять быстрому окислению пигмента, а 5 μг в 1 мл уже способствует его сохранению.

Представлялось интересным выяснить, в какой мере такое действие пара-аминобензойной кислоты зависит от биологического или чисто химического ее влияния. Для этого в первую очередь культуры были подвергнуты тщательному микроскопическому исследованию. Оказалось,

что не только обесцвеченные культуры состояли, как правило, из лизированных клеток, но и в культурах, сохранивших свой пигмент, подавляющее число клеток также находилось в состоянии лизиса. Правда, в этом случае процент живых клеток был несколько выше, чем в обесцвеченных культурах. Однако разница была не настолько значительна, чтобы объяснить сохранение окраски культуры.

Для выяснения сущности обнаруженного явления был поставлен ряд специальных опытов.

Прежде всего культуры, выросшие на средах с витамином $B_1$ и с этим же витамином плюс пара-аминобензойная кислота, помещались при высокой температуре (40° и 50°), чтобы убить клетки, не затрагивая существеннно энзимов. Оказалось, что в том случае, когда среда содержала один витамин $B_1$, обесцвечивание пигмента шло быстро, а в присутствии пара-аминобензойной кислоты пигмент сохранялся. Следовательно, предохраняющее от обесцвечивания действие пара-аминобензойной кислоты связано не только с наличием живых клеток и может в значительной степени зависеть от ее воздействия и на свободные энзимы.

Такие же данные были получены нами и при исследовании скорости обесцвечивания культур, подвергаемых автолизу.

Более того, культуры, убитые кипячением или парами формалина, также сохраняли свой пигмент лучше в том случае, когда в среде имелась пара-аминобензойная кислота.

Все это указывает на тормозящее влияние пара-аминобензойной кислоты на процесс окисления каротиноидов кислородом воздуха. Таким образом, из наших наблюдений следует, что защитная роль пара-аминобензойной кислоты, задерживающей каротиноидные пигменты розовых дрожжей от обесцвечивания зависит, по всей видимости, и от благоприятного влияния на жизнеспособность клеток, и от предохранения каротиноидов от ферментативного окисления, и от окисления свободным кислородом.

Нами уже ранее отмечалось (Мейсель и Медведева [9]), что Rh. aurantiaca может быть также использована в качестве объекта при выяснении вопроса о летучести витаминов, в частности пара-аминобензойной кислоты и витамина $B_1$.

Приношу глубокую благодарность М. Н. Мейселю за руководство работой.

## Выводы

1. Исследованные нами культуры, принадлежащие к виду Rhodotorula aurantiaca, нуждаются в получении извне как витамина $B_1$, так и пара-аминобензойной кислоты.

2. Эти витамины оказывают существенное функциональное и морфогенетическое влияние на клетки микробов.

3. Витамин $B_1$ и пара-аминобензойная кислота являются синергистами, дополняя друг друга в активировании размножения Rh. aurantiaca. Однако по отношению к другим клеточным процессам они могут выступать как взаиморегулирующие факторы. Так, например, витамин $B_1$ способствует значительному накоплению жира, а пара-аминобензойная кислота приводит к полному освобождению клеток от жира.

4. Пара-аминобензойная кислота в присутствии витамина $B_1$ значительно повышает интенсивность поглощения кислорода культурами Rh. aurantiaca, в то время как один витамин $B_1$ такого действия не оказывает.

5. Rh. aurantiaca отвечает количественно усилением размножения на возрастающие концентрации пара-аминобензойной кислоты и может служить индикаторным организмом для обнаружения этого витамина.

6. Пара-аминобензойная кислота предохраняет каротиноидные пигменты в живых клетках и в автолизатах от окисления как ферментативным, так и молекулярным кислородом.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 18.II.1950 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Иерусалимский Н. Д. Ростовые вещества микробов, их природа и значение в жизни микроорганизмов. Микробиология, IX, вып. 7—8, 1940.
2. Иерусалимский Н. Д. и Булаткин А. Д. Влияние ростовых веществ на ацетоно-этиловые бактерии. I. Потребность бактерий в различных витаминоподобных веществах. Микробиология, XIV, вып. 2, 1945а.
3. Иерусалимский Н. Д. Влияние ростовых веществ на ацетоно-этиловые бактерии. II. Отношение бактерий к биотину, тиамину и пара-аминобензойной кислоте. Микробиология, XIV, вып. 6, 1945б.
4. Иерусалимский Н. Д. Новые данные по ростовым веществам микробов (обзор). Микробиология, XVI, вып. 3, 1947а.
5. Иерусалимский Н. Д. Витаминный комплекс среды и развитие микробов (обзор). Микробиология, XVI, вып. 4, 1947б.
6. Медведева Г. А. Биологические регуляторы развития и жизнедеятельности розовых дрожжеподобных организмов. Диссертация, Библиотека Отделения биол. наук, М. 1948.
7. Медведева Г. А. Фолиевая кислота — витамин для дрожжевых организмов. ДАН СССР, LXXVI, № 2, 281, 1951.
8. Мейсель М. Н. Пара-аминобензойная кислота и каротиноидные пигменты. Рефераты работ учреждений Отделения биол. наук АН СССР за 1943 г.
9. Мейсель М. Н., Медведева Г. А. Летучесть некоторых витаминов и возможность их использования микроорганизмами из воздуха. Биохимия, XII, вып. 4, 1947.
10. Ansbacher S. P-aminobenzoic acid a vitamin. Science, 93, No. 2407, 164, 1941.
11. Cook E. and Walch T. Effect of para-aminobenzoic acid and other substances on yeasts respiration and on the respiratory-depressent. Stud. Inst. Divi Tomiae (Cincinnati), **4**, 77, 1945.
12. Cushind J. and Reid E. Pigment production by Neurospora crassa in the presence of para-aminobenzoic acid. J. Bact., **55**, 551, 1948.
13. Cutts N. S. and Rainbow C. Nutrition of a strain of brewer's yeast requiring *p*-aminobenzoic acid. Nature, **164**, No. 4162, 234, 1949.
14. Giese A. C. and Tatum E. The effect of *p*-aminobenzoic acid, pantothenic acid and pyridoxin upon respiration of Neurospora. Arch. Biochem., **9**, 1, 1946.
15. Kohn H. I. and Harris J. S. Methionin mode an essential growth factor by cultivation of E. coli in the presence of methionine and sulfanilamide. J. Bact. **44**, 717, 1942.
16. Kohn H. I. and Harris J. S. On the mode action of the sulfamides. III. Purines, amino acids, peptones and pancrease as antogonists and potentiators of sulfonamide in E. coli. J. Pharmacol., **77**, 1, 1943.
17. Lampen J., Jones M. and Roepke R. Mutant strains of Escherichia coli unable to synthesize *p*-aminobenzoic acid. J. Biol. Chem., 181 (1), 423, 1949.
18. Mayer R. L. A yellow pigment formed from *p*-aminobenzoic acid by Mycobacterium tuberculosis. Var hominis. J. Bact., 48 (3), 337, 1944.
19. Peterson W. H. and Peterson M. S. Relation of bacteria to vitamins and other growth factors. Bact. Rev., **9**, No. 2, 49, 1945.
20. Rainbow C. *P*-aminobenzoic acid, a growth factor for certain brewer's yeasts. Nature, **162**, No. 4119, 572, 1948.
21. Robbins W. J. and Ma R. A. Rhodotorula deficient for para-aminobenzoic acid. Science, **100**, No. 2587, 64, 1944.
22. Rubbo S. D. and Gillespie J. M. Para-aminobenzoic acid a bacterial growth factor. Nature, 146, No. 3713, 838, 1940.
23. Snell E. E. Use of microorganisms for assay of vitamins. Physiol. Rev., **28**, 255, 1948.
24. Woods D. and Fildes P. The anti-sulphanilamide activity *(in vitro)* of *p*-aminobenzoic acid and related compounds. J. Soc. Chem. Ind., **59**, 133, 1940.

# К ХАРАКТЕРИСТИКЕ ШЕРОХОВАТЫХ И ГЛАДКИХ ФОРМ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ

*Г. И. Мосиашвили*

Нами было замечено, что некоторые чистые культуры дрожжей, применяемые в виноделии, изменялись и приобретали иные свойства при развитии их в производстве.

Мы сочли целесообразным выяснить, не происходят ли такого же рода изменения и при развитии этих культур в лабораторных условиях, и в положительном случае попытаться проанализировать причины этого явления.

При проверке культуры Saccharomyces ellipsoideus Кахури № 3, 4, 5, 7 и 10, Штейнберг 1892 г., Цыцка и Саперави № 19 на виноградном сусло-агаре после 48-часового роста дали гладкие колонии с зазубренными краями, но на четвертый-пятый день роста внешний вид некоторых колоний культур Кахури № 5 и 10, а также Штейнберг 1892 г. начал меняться; одни из них были с гладкой поверхностью, типичные, характерные для указанной культуры, другие резко отличались своей сухой поверхностью и желтовато-серым цветом.

Эти наблюдения убедили нас в том, что здесь мы имели дело с так называемой диссоциацией культур с образованием колоний, известных как шероховатые и гладкие формы.

По литературным данным [1, 2, 4, 5], аналогичное явление довольно часто наблюдается у бактерий. Отмечается оно и у дрожжей [3, 6].

Изучение причин такого явления представляет большой практический интерес, поскольку эти культуры до расщепления значительно энергичнее бродят и дают продукт более высокого качества.

Измененные культуры брожение до конца не доводят. Они теряют свойство образовывать зернистый осадок, что также отражается на качестве продукта.

В настоящей работе мы приводим данные о морфологии, физиологии и биохимии шероховатых и гладких форм указанных культур, а также даем некоторые рекомендации хотя бы для временной задержки расщепления культур при использовании их в виноделии.

Причины, вызывающие расщепление дрожжей на шероховатые и гладкие формы, нами изучаются.

## Морфология шероховатых и гладких форм Saccharomyces ellipsoideus

(Кахури № 5, 10, Штейнберг 1892 г.)

После того как из виноградного агара были выделены шероховатые и гладкие формы указанных штаммов, дальнейших расщеплений этих форм в лабораторных условиях больше не наблюдалось. Тем не менее и те и другие формы еще раз были выделены из одной клетки по методу Линднера.

При развитии на различных питательных средах (виноградное сусло, сусло-агар, пивное сусло и пивной сусло-агар) клетки шероховатых форм всегда более крупные, чем гладких форм. Клеточная оболочка шероховатых форм в старых культурах более толстая, иногда даже двухконтурная.

В бродящей среде шероховатые формы развиваются в виде цепочек (рис. 1), а гладкие формы — одиночными клетками (рис. 2).

Способность спорообразования культур шероховатых и гладких форм изучалась на гипсовых блоках.

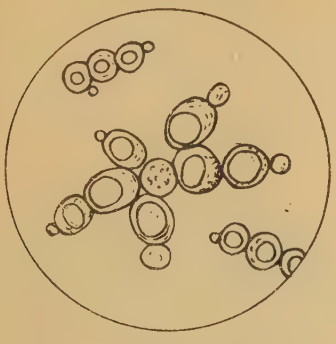


Рис. 1

Рис. 2

Установлено, что в культурах шероховатых и гладких форм споры начинают образовываться по истечении 32 часов и полного своего оформления достигают к 48 часам.

Характерный вид гигантских колоний культур типа шероховатых форм показан на рис. 3 (Кахури № 10) и рис. 4 (Штейнберг 1892 г.).

Вид гигантских колоний гладких форм показан на рис. 5 (Кахури № 10) и рис. 6 (Штейнберг 1892 г.).

## Физиология шероховатых и гладких форм

Размножение. Размножение отдельных клеток в висячей капле сусла изучалось при температуре 26—27°.

В течение 24 часов исходная культура давала 7—11 клеток, шероховатые формы — 5—6 клеток, а гладкая форма — 12—17 клеток.

В висячей капле исходная культура и шероховатая и гладкая формы резко отличались друг от друга по своей структуре, а именно: шероховатая форма размножается в одном направлении, не давая боковых ответвлений, исходная культура дает почти аналогичный рост, гладкая форма, как правило, образует разветвленные цепочки.

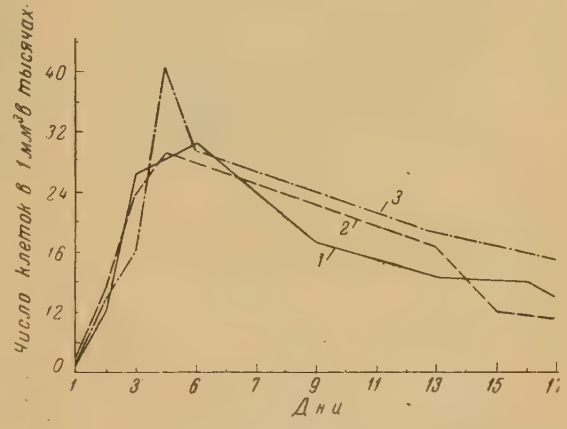



Рис. 7.

*1* — исходная форма; *2* — шероховатая форма; *3* — гладкая форма

Сбраживание углеводов шероховатыми и гладкими формами. Исходные культуры Saccharomyces ellipsoideus Кахури № 5 и 10, Штейнберг 1892 г. и шероховатые и гладкие формы этих культур по отношению к разным углеводам ведут себя одинаково. Они сбраживают глюкозу, левулезу, сахарозу, рафинозу и мальтозу. Не сбраживают лактозы, декстрина и арабинозы.

Способность шероховатых и гладких форм к размножению. Способность к размножению и энергия брожения шеро-

ховатых и гладких форм изучались нами при температуре 26—27° и 12—14°.

С целью выявления возможного отличия в быстроте размножения изучаемых нами культур посевы производились на виноградном сусле, куда вносилось определенное количество посевного материала. Подсчеты производились в камере Тома — Цейса в момент внесения культур, после 24 часов и затем ежедневно до окончания брожения.

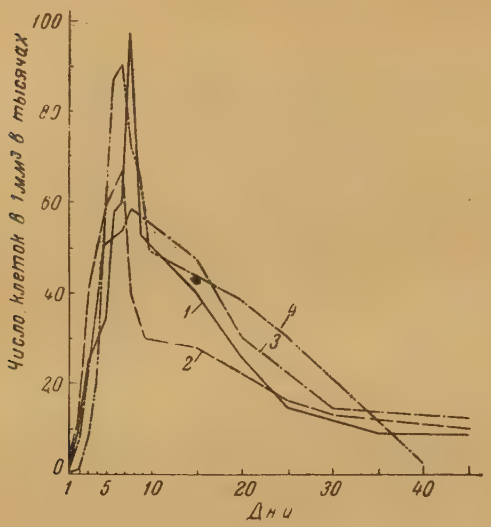



Рис. 8.
— исходная форма; 2 — шероховатая форма; 3 — гладкая форма; 4 — естественные дрожжи

При температуре 26—27° хорошо размножается гладкая форма. Шероховатая форма отстает (рис. 7).

По окончании брожения в сброженной среде обнаруживается большее количество клеток культуры гладкой формы, чем исходной и шероховатой формы.

При температуре 12—14° мы видим совершенно другое явление; в этом случае хорошо размножаются исходная культура и естественные дрожжи.

Шероховатые и гладкие формы от них отстают, причем дрожжи гладкой формы медленнее размножаются, чем шероховатые формы (рис. 8).

Энергия брожения шероховатых и гладких форм. Энергия брожения нами изучалась как в лабораторных (26—27°), так и в полупроизводственных условиях (12—14°), путем учета выделенного $CO_2$.

Для изучения бродильной энергии в лабораторных условиях в литровую колбу наливали 800 мл 18%-ного виноградного сусла; после стерилизации туда вносили 8-часовые культуры указанных форм и помещали при температуре 26—27°. В полупроизводственных условиях в трехлитровую бутыль наливали свежеотжатое нестерильное виноградное сусло с содержанием сахара 20%, в него вносили изучаемые культуры и помещали в подвал, где температура колебалась от 12 до 14%. Контролем было взято то же самое сусло без внесения в него чистой культуры.

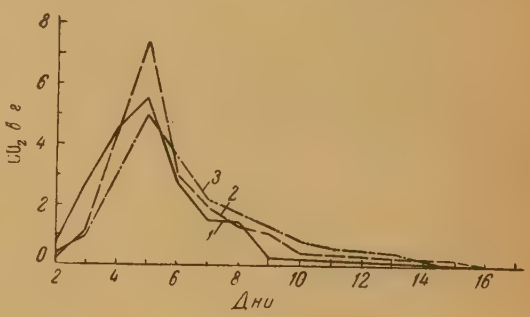



Рис. 9.
1 — исходная форма; 2 — шероховатая форма; 3 — гладкая форма

В лабораторных условиях шероховатые и гладкие формы начинают брожение в первые дни медленно (двое суток), после чего энергия брожения у гладкой формы усиливается и заканчивается на два дня раньше, чем у исходной и шероховатой формы (рис. 9).

В полупроизводственных условиях вначале брожение хорошо проходит с шероховатой формой, потом оно замедляется, в силу чего брожение длится 47 дней. В этих опытах хорошие свойства проявляет

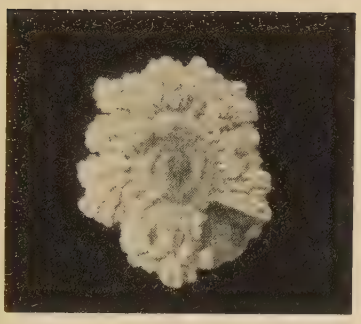


Рис. 3

Рис. 4

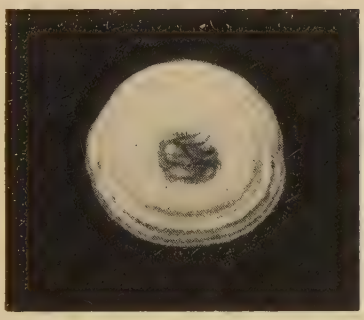


Рис. 5

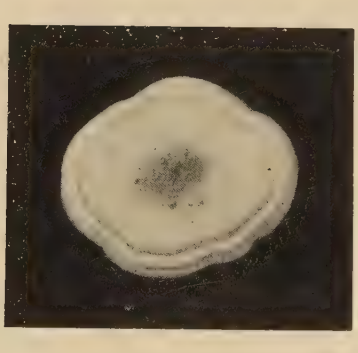


Рис. 6

исходная культура, несмотря на то, что она только на третий день начинает бродить. От этих двух форм значительно отстает гладкая форма, брожение с которой затягивается до 50—60 дней (рис. 10).

В опытах по изучению брожения после полного его окончания определялись основные продукты алкогольного брожения, а именно: спирт (по удельному весу), летучие кислоты (официальным методом) и остаточный сахар (объемным методом Бертрана). Кроме того производилась органолептическая оценка продукции. Результаты анализа даны в табл. 1.

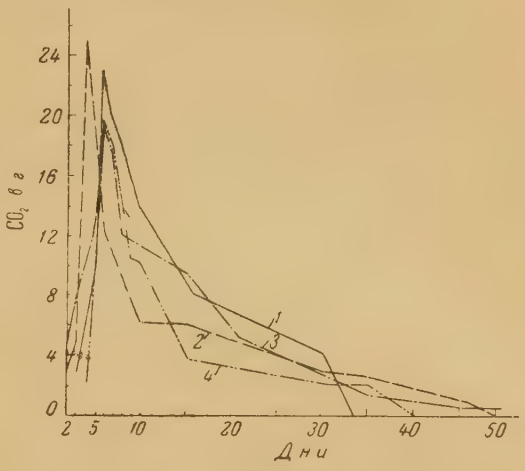



Рис. 10.

*1*—исходная форма; *2*—шероховатая форма; *3* —гладкая форма; *4* — естественные дрожжи

Как видно из табл. 1, дрожжевые шероховатые формы по сравнению с другими культурами дают больше спирта. Необходимо отметить также, что клетки этого типа дают крупнозернистый, быстро отделяющийся осадок, который не пристает ко дну посуды.

Гладкие формы дрожжей образуют тестообразный клейкий осадок, плотно прилипающий ко дну и требующий длительного взбалтывания для отделения от него. В отличие от шероховатой формы у гладкой формы после взбалтывания просветление наступает не раньше трех-четырех дней.

Таблица 1

**Основные продукты алкогольного брожения в лабораторных условиях (в граммах на литр)**

| Вариант | Спирт | Летучие кислоты | Остаточный сахар |
|---|---|---|---|
| Кахури № 10 исходная форма . . . | 80,0 | 0,37 | 1,20 |
| „ № 10 шероховатая форма . . | 85,0 | 0,27 | 1,10 |
| „ № 10 гладкая форма . . . . | 80,0 | 0,30 | 0,90 |
| „ № 5 исходная форма . . . | 81,0 | 0,40 | 1,12 |
| „ № 5 шероховатая форма | 85,5 | 0,37 | 0,90 |
| „ № 5 гладкая форма . . . . | 82,0 | 0,38 | 0,90 |
| Штейнберг 1892 г. исходная форма | 81,9 | 0,56 | 0,18 |
| „ шероховатая форма . . . | 84,5 | 0,36 | 0,90 |
| „ гладкая форма . . . . . | 82,5 | 0,38 | 0,80 |

Осадок исходной культуры бывает двухслойный: плотный тестообразный и зернистый.

Как в полупроизводственных, так и в лабораторных условиях шероховатая форма дает больше спирта (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что культуры гладкой формы образуют несколько больше кислот, чем другие культуры.

И в лабораторных и в полупроизводственных условиях культуры шероховатых форм по сравнению с другими культурами дают, по данным химических анализов и органолептической оценки, хорошую продукцию.

Таблица 2

**Основные продукты алкогольного брожения в полупроизводственных условиях (в граммах на литр)**

| Вариант | Спирт | Летучие кислоты | Общая кислота | Сахар |
|---|---|---|---|---|
| Естественные дрожжи . . . . . | 81,4 | 0,73 | 5,4 | 2,5 |
| Кахури № 10 исходная форма . . . | 89,1 | 0,62 | 5,8 | 1,2 |
| „ № 10 шероховатая форма | 89,1 | 0,65 | 5,6 | 1,0 |
| „ № 10 шероховатая форма | 89,8 | 0,62 | 5,3 | 0,8 |
| „ № 10 гладкая форма . . . . | 83,5 | 0,89 | 6,3 | 1,5 |
| „ № 10 гладкая форма . . . . | 85,6 | 0,90 | 6,5 | 1,6 |
| „ № 5 исходная форма . . . | 87,0 | 0,71 | 5,6 | 1,2 |
| „ № 5 шероховатая форма | 89,8 | 0,59 | 5,7 | 1,2 |
| „ № 5 шероховатая форма | 87,7 | 0,61 | 5,8 | 1,0 |
| „ № 5 гладкая форма . . . . | 85,6 | 0,79 | 5,9 | 1,5 |
| „ № 5 гладкая форма . . . . | 83,5 | 0,81 | 5,7 | 1,6 |
| Штейнберг 1892 г. исходная форма | 87,7 | 0,65 | 5,7 | 1,0 |
| „ шероховатая форма . . | 87,7 | 0,55 | 5,2 | 1,0 |
| „ гладкая форма . . . . . | 85,6 | 0,83 | 6,0 | 1,5 |

При этом физические свойства осадков во время полупроизводственного опыта не изменились: шероховатая форма дает зернистый осадок, гладкая форма — тестообразный и исходная культура — смешанный.

## Выводы

Saccharomyces ellipsoideus Кахури № 5 и 10 и Штейнберг 1892 г. и их шероховатые и гладкие формы отличаются друг от друга основными морфологическими особенностями.

Величина клеток шероховатой формы штаммов S. ellipsoideus Кахури № 5 и 10 и Штейнберг 1892 г. достигает 12—16 μ. Клетки гладкой формы в большинстве случаев мелкие эллипсоидные, размером 3,5 : 3,5 × × 3,5 : 7,5 μ. Клетки шероховатой формы иногда образуют отчетливо двуконтурную оболочку. В бродящей жидкости культуры шероховатой формы развиваются в виде цепочки, тогда как культуры гладкой формы растут отдельными клетками или попарно. Спорообразование у шероховатых и гладких форм происходит одновременно и завершается в течение 48 часов. Гигантские колонии шероховатой и гладкой форм четко отличаются друг от друга своей структурой, поверхностью, цветом, формой, величиной и т. д.

По отношению к разным углеводам шероховатые и гладкие и исходные культуры не различаются между собой.

Культура гладкой формы при 26—27° характеризуется более интенсивным развитием, чем исходная и шероховатая культуры. И наоборот, при 12—14° более интенсивно размножаются исходная и шероховатая культуры, а гладкая культура отстает.

Изученные нами культуры также отличаются и по бродильной энергии, а именно, при 26—27° бродильная энергия больше у гладкой формы, а при 12—14° бродильная энергия больше у культур исходной и шероховатой форм.

Брожение у гладкой формы протекает очень медленно, иногда продолжается несколько месяцев.

Изученные культуры отличаются также и по продуктам брожения: шероховатая форма образует больше спирта, нормальное количество кислот и органолептически лучшее вино, чем гладкая форма.

На основании изложенных выше фактов мы считаем необходимым отбирать для производства шероховатую форму и перед началом сезона виноделия каждый раз убеждаемся в том, что она не расщепляется с образованием гладкой формы.

Институт виноградарства и виноделия
Академии Наук Грузинской ССР
г. Телави

*Получено 20.V.1950 г.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. А. Изменчивость бактерий. Микробиология, X, вып. 1, 1941.
2. Красильников Н. А. Изменчивость проактиномицетов и микобактерий. Микробиология, VII, вып. 1, 1938.
3. Кудрявцев В. И. и Косиков К. В. Исследование ферментативных свойств у некоторых межвидовых гибридов рода Saccharomyces. Микробиология, XVI, вып. 6, 1941.
4. Раутенштейн Я. И. Изменчивость Bacillus mycoides (Flügge). Микробиология, XVI, вып. 1, 1947.
5. Черномордик А. Б. Явления диссоциации у B. pyocyaneus. Журн. микроб., эпидем. и иммунобиол., № 12, 87, 1940.
6. Fabian F. W. and Wickerhan L. I. Products of fermentation S-and R.-forms of yeasts. J. Agr. Res., 54, 147, 1937.

# БАКТЕРИИ И МОРСКИЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

*В. О. Калиненко*

Взаимоотношения между бактериями и морскими беспозвоночными животными изучались, главным образом, с санитарной точки зрения. В частности, внутри тела устриц были найдены живые брюшнотифозные бактерии. Так как устрицы съедаются людьми в сыром виде, близость устричных заводов и природных устричных колоний к канализационным стокам возбуждала внимание эпидемиологов.

Ворошилова и Дианова [1] в лабораторных опытах установили, что бактерии поедаются планктонными животными. Серия очень интересных и методически важных работ по питанию планктонных организмов бактериями вышла из лаборатории Гаевской [2, 3, 4]. Крисс [8] заметил в Черном море, что в зоне обильного развития растительного и животного планктона количество микроорганизмов очень сильно возрастает. Как ведут себя бентосные животные, заглатывающие ил: может быть, они не только переваривают часть бактерий, но и обогащают ими подстилающий грунт?

Мы сосредоточили свое внимание на изучении количества бактерий внутри морских беспозвоночных в связи с различными мнениями о работах по акклиматизации Nereis succinea в Каспийском море. Этот растительноядный многощетинковый червь, переселенный из Черного моря в Каспийское Зенкевичем, Бирштейном и др. [5, 6, 7], поглощает донный ил. Он размножился в Каспии в значительном количестве и стал излюбленной пищей осетровых рыб. Но это замечательное вмешательство гидробиологов в жизнь природы возбудило возражения в том смысле, что нереиды могут стать хищниками и их огромное развитие истощит питательные ресурсы моря.

Перед бактериологом в связи с этим возникает следующая специальная задача: определить, уменьшается ли количество бактерий в иле, прошедшем через пищеварительную трубку животных, поглощающих ил.

Приступив к экспериментам в этой области, мы расширили нашу задачу и стали изучать присутствие бактерий в кишечнике не только илоедов, но и других животных, обитающих на дне, в первую очередь губок. В этой работе мы опишем опыты с иглокожими, голотуриями и губками. С асептическими предосторожностями мы вскрывали ежей и голотурий и отрезали от пищеварительной трубки у головного и анального концов куски длиной 1—2 см. Куски переносились во взвешенные колбы с стерильной морской водой.

Собрав возможно большее количество соответствующих отрезков, мы вновь взвешивали колбы и определяли весовое отношение головных отрезков, а в другой колбе — анальных кусков к 100 мл морской воды. Затем стерильным шпателем тщательно раздавливали в колбах кишечные отрезки и взбалтывали их не менее 5 минут, заткнув горлышки колб стерилизованными резиновыми пробками.

Из первоначальной взвеси делались дальнейшие десятикратные разбавления, которые также усиленно взбалтывались в 100 мл стерильной воды. Однокубиковыми пипетками взвеси головных и анальных концов переносились в чашки Петри и заливались рыбопептонным агаром. Через одни-двое суток выросшие на чашках колонии подсчитывались. В на-

шем способе вместе с илом в исходные болтушки попадали и обрывки тканей кишечной трубки иглокожих и голотурий. При изобилии материала в будущем для большей точности счета бактерий надо стремиться выбирать из пищеварительной трубки только один ил. Результаты подсчетов представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Количество бактерий в подстилающих грунтах и в разных частях пищеварительной трубки морских животных**

| Животное | К-во бактерий в 1 г морского грунта | К-во бактерий в начале пищеварительной трубки | К-во бактерий в конце пищеварительной трубки | % увеличения к-ва бактерий в анальной части в сравнении с таковым в головной |
|---|---|---|---|---|
| Голотурии (Meriotrocus) . . . . . | 670 | 500 | 1 200 | 240 |
| Морские ежи (Brisaster fragilis) . . | 12 490 | 4 333 | 28 000 | 642,2 |
| Trochostoma . . . . . | 140 000 | 135 750 | 156 000 | 114,92 |
| Elpidia glacialis . . . . . | 390 000 | 361 130 | 413 870 | 114,6 |
| Phascolosoma . . . . . | 425 000 | 184 500 | 496 000 | 268,83 |

Из таблицы видно, что у всех животных илоедов ил анального конца богаче бактериями, чем ил головной части.

Существует прямая зависимость между количеством бактерий, обитающих в иле, и густотой бактериального населения в кишечнике морских животных. Морские животные, живущие на илах, бедных бактериями, содержат в кишечном иле ничтожное количество микроорганизмов. Очень яркой иллюстрацией к только что сказанному является анализ голотурий, поднятых с громадных глубин.

Голотурии (Elpidia glacialis) исследовались нами немедленно. В стерилизованных чашках они обильно обливались струей стерильной морской воды. Из их пищеварительных трубок вырезывались головные и анальные отрезки, и из отрезков готовились болтушки в стерильной морской воде. Подсчеты бактерий на чашках показывают следующее:

1. Количество бактерий в иле из кишечника глубоководных голотурий ничтожно (10 клеток в 1 г натурального ила).

2. Ил, на котором жили исследованные голотурии, также беден бактериями (83 клетки в 1 г натурального ила).

Заметно, что в передней части пищеварительной трубки количество бактерий в иле меньше, чем в окружающем и подстилающем иле.

Часть бактерий, очевидно, переваривается морскими животными; оставшиеся же бактерии энергично размножаются и по мере движения ила к концу кишечной трубки компенсируют убыль.

Ил, вышедший из кишечника голотурий и иглокожих, содержит обычно бактерий не меньше, чем подстилающий ил.

## О бактериях внутри морских губок

Очень своеобразны взаимоотношения между бактериями и губками, просасывающими через свое тело морскую воду. В органической взвеси, попадающей в губку с током воды, есть такие вещества как хитин и целлюлоза, переваривать которые в состоянии только бактерии. Не этим ли объясняется изумительное богатство бактерий в теле губок, издающих острый, специфический запах бактериальных процессов? Не про-

исходят ли в теле губки процессы, при которых бактерии упрощают сложные тела морского детрита, подготавливая их ассимиляцию воротничковыми и другими клетками губчатой стромы?

Тело губок не является простым фильтром. Бактерии внутри этого животного, как видно из табл. 2, размножаются. Губки создают удобный приют для развития бактерий. К этим заключениям приводит нас сравнение количеств бактерий в морской воде вне губки и в отжиме воды из тела губки. В табл. 2 приведены данные, из которых видно, что в отжиме из губок бактерий в десятки тысяч раз больше, чем в окружающей морской воде.

Таблица 2

**Сравнительные количества бактерий в морской воде, омывающей губок, и внутри самих губок**

| Номер станции, на которой губки были подняты со дна | | К-во бактерий в 1 мл окружающей морской воды | К-во бактерий в 1 мл морской воды, отжатой из тела губок | Во сколько раз в морской воде из тела губок бактерий больше, чем в окружающей воде |
|---|---|---|---|---|
| Raspallia | 107 | 3 | 237 000 | 79 000 |
| » | 107 | 6 | 211 500 | 32 550 |
| » | 107 | 6 | 191 100 | 31 833 |
| » | 121 | 25 | 680 000 | 27 200 |

Состав бактерий в морской воде, отжатой из губок, тот же самый, что и в окружающей морской воде.

Для подсчета общего количества бактерий асептически вырезывались кусочки тела губки. Эти кусочки брались ниже поверхностного слоя тела. Собранные кусочки отжимались стеклянным шпателем, и отжатая вода переносилась для дальнейших разбавлений, облегчающих счет колоний. Если взять большой кусок губки, то из нее в стерильную чашку Коха можно в несколько секунд собрать морскую воду, свободно вытекающую из тела губки.

Следовательно, возможно обойтись и без давления на губку шпателем.

Интересно остановиться на подробностях анализа одной из станций. Придонная морская вода на этой станции имела 25 бактерий в 1 мл. В морской воде, вытекающей из тела губки, было 680 000 бактерий в 1 мл, т. е. в 26 200 раз больше, чем в толще воды на той же глубине и в том же самом месте. Грунт, на котором сидела эта губка, содержал 500 бактерий в 1 г, а в пересчете на грунтовую воду 2220 бактерий в 1 мл. Следовательно, морская вода, вытекшая из тела губки, имела на 679 500 бактерий больше, чем подстилающий грунт. Этот факт очень важен: мы до сих пор считали, что в море больше всего бактерий в грунтах. В действительности, морские организмы, обитающие на грунтах, являются собирателями и хранителями бактерий.

Каждая капля морской воды, прошедшая через тело губки или моллюска, содержит в тысячи раз больше бактерий, чем до своего поступления внутрь этих животных. Обогатительную в этом отношении роль морских организмов мы обнаруживали ежедневно, не только при изучении отжимов из губок, но и косвенным образом.

Дело в том, что днище экспедиционного корабля, не очищавшееся от обрастаний после длительного плавания, обросло морскими организмами и представляло собой пловучий ценоз.

Каждое колебание на волне вымывало из этого ценоза огромное количество бактерий в зону, окружающую корабль (в среднем вода, окружающая корабль, имела 5000—6000 бактерий вместо истинных 1—5 клеток в 1 мл морской воды).

Чтобы избавиться от бактерий, вымытых из днища корабля, надо было брать пробу, или, отъехав на несколько сот метров от судна, или опустив батометр с борта ниже 5 м от уровня моря.

## Выводы

1. Ил анального конца кишечника морских грунтоедов (ежей, голотурий) содержит больше бактерий, чем головной конец. При прохождении через кишечник этих животных ил обогащается бактериями. Как правило, экскременты илоедов всегда содержат бактерий больше, чем подстилающий ил. Если окружающий ил беден бактериями, как это бывает на больших глубинах морей и океанов, то и в кишечнике илоедов количество бактерий соответственно мало.

2. Морфологические и биохимические признаки бактерий из кишечника илоедов и из подстилающего ила одинаковы.

3. В воде, пропитывающей тело морских губок, количество бактерий в сотни тысяч раз больше, чем в окружающей морской воде. Тело губки создает благоприятные условия для морских бактерий. Здесь бактерии, обитающие в непрерывном токе свежей морской воды, энергично размножаются. Между бактериями и губками, очевидно, возникают взаимнополезные отношения: губки всасывают свежие струи воды, бактерии ведут активную биохимическую работу в этом потоке. Косвенным признаком энергичной деятельности бактерий в теле губок является острый запах, издаваемый губками и характерный для бактериальной редукции сульфатов и протеолитических распадов.

Институт океанологии
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 21.IV.1950 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ворошилова А. и Дианова Е. Роль планктона в размножении бактерий в изолированных пробах морской воды. Микробиология, VI, вып. 6, 1937.
2. Гаевская Н. С. О некоторых новых методах в изучении питания водных организмов. Зоологич. журн., XVIII, вып. 6, 1939.
3. Гаевская Н. С. О методах выращивания живого корма для рыб. Тр. Московского технич. ин-та рыбной промышленности и хозяйства им. А. И. Микояна, вып. 3, 1940.
4. Гаевская Н. С. Некоторые задачи гидробиологии в области рыбного хозяйства. Рыбное хозяйство, № 10, 1947.
5. Зенкевич Л. А. Об акклиматизации в Каспийском море новых кормовых (для рыб) беспозвоночных и теоретические к ней предпосылки. Бюлл. Моск. об-ва испыт. природы, XLIV, № 1, 1940.
6. Зенкевич Л. А. и Бирштейн Я. К вопросу об акклиматизации в Каспийском и Аральском морях новых видов животных. Зоологич. журн., XVI, № 3, 1937.
7. Зенкевич Л. А., Бирштейн Я. и Карпевич А. Ф. Первые успехи реконструкции фауны Каспийского моря. Зоологич. журн., XXIV, № 1, 1945.
8. Крисс А. и Рукина Е. Микробиология Черного моря, Распространение микроорганизмов в водной толще Черного моря, Микробиология, XVIII, 141, 1949.

# МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФЛОРЫ В НЕФТЕНОСНЫХ ФАЦИЯХ ВТОРОГО БАКУ

*В. А. Экзерцев*

Многие исследователи полагают, что бактериальная флора принимает участие в процессах рудообразования, в формировании и разрушении горных пород (Буткевич [1]; Омелянский [8]; Таусон [9]. Считается также общепринятым взгляд, что микроорганизмы играют важную роль в начальных стадиях образования нефти. С этой точки зрения особый интерес представляют исследования микрофлоры газоносных и нефтеносных геологических структур. Гинзбург-Карагичева [3,4], а затем Bastin [13] и другие установили факт присутствия бактерий, восстанавливающих сульфаты, в пластовых водах нефтеносных месторождений. Исаченко [5] в нефтеносных водах Сураханского месторождения обнаружил пурпурных серобактерий. Микрофлору пластовых вод нефтеносных фаций Второго Баку изучала Штурм [11, 12]. В частности, ею подробно описана большая физиологическая группа десульфурирующих бактерий. Кузнецов [6], исследуя вопрос о возможности современного образования метана, отмечает высокую заселенность бактериями газоносных и нефтеносных пластов.

Задачей настоящей работы являлось установление наличия и количественной оценки бактериального населения в глубинных породах нефтеносных фаций Второго Баку путем применения микроскопических методов к изучению микрофлоры.

Материал был собран нами в течение лета 1948 г., когда мы участвовали в Поволжской экспедиции Института нефти Академии Наук СССР, возглавляемой С. Ф. Федоровым. Микробиологическим отрядом руководил С. И. Кузнецов..

## Методика

Микроскопические исследования бактериальной флоры в глубинных осадочных породах газоносных и нефтеносных продуктивных толщ мы вели двумя методами: 1) путем изготовления микроскопических препаратов и 2) методом тонких шлифов, широко применяемым в геологической практике.

Микроскопические препараты изготовлялись по способу Германова в модификации Научного института по удобрениям (Наумова [7]). Исходным материалом для этого служили керны пород из различных стратиграфических горизонтов. Большинство кернов было отобрано на самом месторождении из разведывательных и эксплуатационных буровых скважин. Часть кернов была получена из кернохранилищ. Учитывалось при этом, чтобы срок хранения кернов после отбора их из скважин был не слишком велик. В лаборатории керны тщательно очищались от поверхностных загрязнений и растирались в стерильной фарфоровой ступке. Суспензия для препарата готовилась из 1 г хорошо размельченной породы. С этой целью навеска переносилась на обычный бумажный фильтр и промывалась 2 *N* раствором NaCl до исчезновения реакции на ион кальция в промывных водах. Образцы пород, содержащие преиму-

щественно кальциевые соли, промывались 0,5%-ным раствором HCl. Затем фильтр разрывался и порода смывалась 25 мл 0,004 нормального раствора NaOH в колбочку Эрленмейра на 100 мл. Содержимое колбочки в течение 10 минут взбалтывалось, в результате чего достигалось диспергирование породы. Болтушка разливалась в пробирки и центрифугировалась 3 минуты при 2500 оборотах в минуту. Фильтр вновь промывался 25 мл NaOH, промывные воды переводились в пробирки и после взбалтывания осадка центрифугировались. Взвесь сливалась в мерную колбу на 100 мл. Из полученной таким путем суспензии приготовлялись три параллельных препарата. Окрашивались препараты 5%-ным раствором карболового эритрозина в течение 6—7 часов. Под микроскопом просматривалось два препарата из каждого образца по 20 полей зрения в каждом из них. Подсчет бактерий производился с помощью сетчатого окулярного микрометра с иммерсионным объективом при увеличении в 900 раз.

Были приняты все меры к тому, чтобы устранить возможность случайного заражения бактериальной флорой исследуемого образца.

Для этого дестиллированная вода, из которой готовились растворы NaCl, NaOH, HCl и агар-агар, предварительно фильтровалась через бактериальный мембранный фильтр.

Достоверность полученных результатов подсчета бактериального населения методом Германова мы решили проверить путем изготовления тонких шлифов. Из керна выпиливалась лобзиком пластинка толщиной не свыше 3 мм и длиной до 2 см. Канадским бальзамом она приклеивалась к предметному стеклу и шлифовалась на матовом стекле с помощью прокаленного тонкого наждачного порошка. Для придания большей эластичности шлифуемой поверхности к наждачному порошку добавлялось несколько капель стерильного глицерина и немного дестиллированной воды. Пластинка шлифовалась до толщины не более 2—3 μ. Шлиф красился 3%-ным раствором карболового эритрозина в течение 8 часов. Затем он тщательно промывался в проточной воде и подсушивался. При помощи соответствующего увеличения под микроскопом мы могли просмотреть расположение клеток бактерий в толще шлифа с поперечным сечением приблизительно около 2—3 μ. Отсюда легко было определить объем 1 см³ исследуемой породы и подсчитать общее количество бактерий, распределенных в этом объеме по формуле:

$$K = \frac{10^8 \cdot 3000 \cdot a}{b \cdot c},$$

где $10^8 \cdot 3000$ — объем 1 см³ породы, $a$ — количество бактерий в просчитанных полях зрения, $b$ — площадь сетчатого окулярного микрометра, выраженная в квадратных микронах, $c$ — число полей зрения. Зная удельный вес породы, мы могли произвести соответствующие пересчеты количества бактерий на 1 г сухой породы.

## Результаты исследований

Поскольку широко применяемый на практике учет бактерий путем посевов на питательные среды не дает истинной картины заселенности микроорганизмами изучаемого объекта, то мы ввиду этого применили метод непосредственного микроскопического исследования для учета бактериальной флоры в нефтеносных породах.

Этим методом были проанализированы образцы глубинных осадочных пород различного геологического возраста из саратовских и бугурусланских нефтеносных месторождений. Глубины отбора образцов колебались в пределах от 300 до 2100 м.

Данные анализов сведены в табл. 1.

Таблица 1

**Микроскопический учет бактерий в кернах пород**

| № образца | Район месторождения | Стратиграфическая характеристика образца | Характеристика породы | Количество бактерий в млн. на 1 г породы |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Бугуруслан | Пермь, Кунгурский ярус | Известняк с запахом нефти | 35 |
| 2 | „ | То же | Доломит | 0 |
| 3 | „ | „ „ | Ангидрит | 94 |
| 4 | „ | „ „ | Доломит, пропитанный нефтью | 105 |
| 5 | „ | Пермь, Нижне-Казанский ярус | Доломит с запахом нефти | 23 |
| 6 | „ | Пермь, Кунгурский ярус | Доломит | 0 |
| 7 | „ | Карбон, Намюрский ярус | Доломит, пропитанный нефтью | 70 |
| 8 | „ | То же | То же | 117 |
| 9 | „ | Карбон, Турнейский ярус | „ „ | 83 |
| 10 | „ | Средний девон | Песчаник, пропитанный нефтью | 47 |
| 11 | Саратов | Карбон, угленосная свита | Песчаник с запахом нефти | 23 |
| 12 | „ | То же | Черная глина с запахом нефти | 12 |
| 13 | „ | „ „ | Черная глина | 0 |
| 14 | „ | „ „ | Песчаник | 35 |
| 15 | „ | „ „ | Серая глина | 0 |
| 16 | „ | Карбон, Турнейский ярус | Доломит, пропитанный нефтью | 70 |
| 17 | „ | Средний девон | Песчаник с запахом нефти | 70 |

Просматривая полученные результаты, мы можем отметить, что в ряде образцов из горизонтов, где не было проявлений нефти, не удалось обнаружить и бактериального населения. В образцах с явными признаками нефтеносности было учтено в среднем от 12 до 117 млн. бактериальных клеток на 1 г сухой породы. Однако необходимо отметить, что в ряде случаев у нас возникало сомнение в достоверности полученных величин, так как при подсчете в 20 полях зрения микроскопа зачастую получалось 3—5 бактерий. Вследствие этого мы решили для проверки порядка полученных величин ряд образцов проанализировать другим методом — путем учета бактерий в тонких шлифах.

Количественный учет бактерий с помощью тонких шлифов нам удалось произвести только в некоторых образцах пород. Большинство шлифов из глин в силу технических затруднений при их изготовлении оказалось мало пригодным для наших целей. При просмотре под микроскопом достаточно отчетливой и ясной картины в этих шлифах мы не получили.

Ниже в табл. 2 мы приводим результаты исследований под микроскопом нефтеносных пород (образцы 8, 9 и 11) и пород без признаков нефте- или газопроявления (образцы 3 и 13), полученные методом учета бактерий в тонких шлифах.

Если сопоставить данные первой и второй таблиц по одноименным образцам, то можно придти к заключению, что количество микроорганизмов в нефтеносных породах выражаются одним и тем же порядком величин. Число бактериальных клеток в препаратах колеблется в пределах от 12 до 117 млн., а в шлифах — от 10 до 21 млн. в пересчете на

Таблица 2

**Микроскопический учет бактерий в шлифах**

| № образца | Район месторождения | Стратиграфическая характеристика образца | Характеристика породы | Количество бактерий в млн. на 1 г породы |
|---|---|---|---|---|
| 3 | Бугуруслан | Пермь, Кунгурский ярус | Ангидрит . . . . . | 10 |
| 8 | „ | Карбон, Намюрский ярус | Доломит, пропитанный нефтью . . . . . | 16 |
| 9 | „ | Карбон, Турнейский ярус | То же . . . . . | 21 |
| 11 | Саратов | Карбон, угленосная свита | Песчаник с запахом нефти . . . . . | 11 |
| 13 | „ | То же | Черная глина . . . . . | 0 |

1 г сухой породы. В шлифах их значительно меньше, чем в препаратах из того же образца. Повидимому, это зависит от характера структуры исследуемой породы, не дающей возможности полностью учитывать бактериальное население из-за адсорбции бактерий.

## Обсуждение полученных результатов

Мы стремились по возможности установить факт присутствия микрофлоры в осадочных породах нефтеносных фаций. Положительные результаты получены в преобладающем большинстве случаев. Из общего числа образцов 76% были заселены микроорганизмами, и только в 24% нам совершенно не удалось обнаружить бактериальной флоры. Бактерии, хорошо окрашивающиеся плазменной краской, были обнаружены в древнейших осадочных породах палеозоя, а именно они встречались в пермских отложениях, в пластах каменноугольной системы и даже в породах девонского периода на глубине свыше 2000 м. Полученные данные вполне отвечают взглядам Вернадского [2] и Исаченко [5], которые считали, что нижняя граница биосферы находится на большой глубине, достигающей 2000 м, но она, по мнению этих авторов, может быть отодвинута при дальнейших исследованиях еще ниже вплоть до 3000—4000 м, так как глубина распространения микроорганизмов обуславливается температурой, увлажением породы и наличием биогенных элементов. По своим морфологическим признакам бактерии глубинных пород напоминают обычную микрофлору. Преимущественно встречаются организмы, имеющие форму вибриона или длинных палочек размером $2{,}5 \times 0{,}3$ μ.

Бактериальное население, как это видно из табл. 1, в породах некоторых стратиграфических горизонтов по количеству превышает 100 млн. клеток на 1 г сухой породы. Отмечается повышенное содержание бактерий в кернах пород, пропитанных нефтью. Относительным богатством микрофлоры отличаются доломиты и песчаники с явными признаками нефтеносности. Являясь хорошими коллекторами нефти, эти породы, очевидно, обладают вместе с тем и благоприятным субстратом для микроорганизмов. Так, доломитный керн, пропитанный нефтью, из Намюрского яруса с глубины, превышающей 700 м (район бугурусланских месторождений), содержал 117 млн бактериальных клеток на 1 г породы. Образец песчаника с признаками нефтеносности из отложений Среднего девона с глубины более 2000 м (район саратовских геологических структур) имел 70 млн. клеток. Глины заселены в меньшей степени. Например, в отложениях черных глин из угленосной свиты на глубине около 1000 м (район Саратова) учтено только 12 млн клеток на 1 г породы, тогда как в двух других образцах глины микроскопическим методом обнаружить бактерий не удалось. Интересно отметить, что в ан-

гидрите из пермских отложений (район Бугуруслана) на глубине около 700 м оказалось 94 млн. бактериальных клеток. Очевидно, в процессе своего метаболизма эти бактерии способны использовать сложное органическое вещество, встречающееся в ангидрите.

Результаты учета бактериального населения в глубинных породах по методу Германова и с помощью тонких шлифов оказались достаточно совпадающими. Числовые значения количества бактерий на единицу измерения выражаются величиной одного и того же порядка. Так, например, в препарате из образца, отобранного из угленосной свиты (район Саратова) на глубине около 900 м, было учтено 23 млн. бактериальных клеток, а в шлифе, приготовленном из этого же образца, 11 млн. клеток на 1 г сухой породы. В препарате из образца отложений Турнейского яруса (район Бугуруслана) с глубины около 1600 м количество бактерий было 83 млн., а в шлифах их оказалось 21 млн. В образце черной глины из угленосной свиты (район Саратова) на глубине примерно 1100 м микроорганизмы не были обнаружены ни в бактериальных препаратах, ни в шлифах. Таким образом, полученные нами двумя различными методами величины порядка миллионов бактериальных клеток в 1 г породы указывают на существование бактериальной флоры в недрах земли на больших глубинах. Есть основания считать, что это не вымершие ископаемые формы микроорганизмов, как полагают некоторые исследователи, а живая биохимически активная микрофлора, проделавшая в течение многих геологических периодов эволюционный путь (Таусон [10]). Тот громадный запас углекислоты, который находится в пластах осадочных пород, повидимому, регулярно пополняется за счет жизнедеятельности этих микроорганизмов. В результате дыхания бактерий в сутки может выделиться приблизительно 2 г углекислоты на 1 т грунта (Кузнецов [6]).

Полученные нами цифры дают возможность объяснить и другие биохимические процессы, протекающие в недрах Земли. Так, бактериям в ряде случаев можно приписать немаловажную роль в образовании метана, в разрушении нефти, в пополнении запасов серы за счет десульфуризации и др.

ZoBell [14] придает большое значение микроорганизмам при освобождении нефти из осадков. Он указывает, что десульфурирующие бактерии, а может быть и некоторые другие анаэробные виды, способны растворять карбонаты. При этом нефть, адсорбированная породой, освобождается. В результате растворения карбонатов в породах образуются поровые пространства, которые являются резервуарами накопления нефти и, кроме того, каналами для ее передвижения. Под давлением газов, образующихся за счет жизнедеятельности микроорганизмов, по этим каналам нефть перемещается внутри залежи.

## Выводы

1. Микроскопическими методами анализа глубинных осадочных пород нефтеносных месторождений установлено наличие бактериальной флоры в пермских отложениях, в пластах каменноугольной системы и в песчаниках Девонского периода на глубине, превышающей 2000 м.

2. Количественный учет бактериального населения в породах нефтеносных фаций Второго Баку показывает, что общее число бактериальных клеток в 1 г сухой породы колеблется в пределах от 10 до 117 млн.

3. Нефтеносные породы содержат повышенное количество микроорганизмов. Породы не нефтеносные имеют чрезвычайно бедное бактериальное население, в ряде случаев не учитываемое методами непосредственного счета под микроскопом.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 19.IV.1950 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Буткевич В. С. Образование морских железо-марганцовых отложений и участвующие в нем микроорганизмы. Тр. Морского научного ин-та, III, вып. 3, 1928.
2. Вернадский В. И. О пределах биосферы. Изв. АН СССР, Серия геологич. № 1, 1937.
3. Гинзбург-Карагичева Т. Л. Микробиологическое исследование серно-соленых вод Апшерона. Азерб. нефт. хоз., № 6—7, 1926.
4. Гинзбург-Карагичева Т. Л. Микробиологические очерки. Гос. научно-техн. нефтяное изд-во, 1932.
5. Исаченко Б. Л. Пурпурные серобактерии с нижних границ биосферы. Сб., посвященный президенту АН СССР В. Л. Комарову, 1939.
6. Кузнецов С. И. Изучение возможности современного образования метана в газо-нефтеносных фациях района Саратова и Бугуруслана. Микробиология, XIX, вып. 3, 1950.
7. Наумова А. Н. Методы непосредственного счета микроорганизмов в почве и характеристика отдельных почв Союза. Тр. Науч. ин-та по удобрениям им. Я. В. Самойлова, вып. 108, 115, 1933.
8. Омелянский В. Л. Роль микроорганизмов в выветривании горных пород. Юбилейный сборник, посвященный И. П. Бородину. Ленинград, 1927.
9. Таусон В. О. Великие дела маленьких существ. Изд. АН СССР, 1948.
10. Таусон В. О. Об эволюции микроорганизмов в течение геологических эпох. Архив биол. наук, XLIII, вып. 2—3, 1936.
11. Штурм Л. Д. Микроорганизмы нефтяных месторождений Второго Баку. Рефераты работ учреждений и Отделения биол. наук АН СССР за 1940 г. Изд. АН СССР, 1941.
12. Штурм Л. Д. Микроскопическое исследование нефтеносных пластовых вод. Микробиология, XIX, вып. 1, 1950.
13. Bastin E. S. The problem of the natural reduction of sulphates. Bull. Am. Ass. Petrol. Geologists, **10**, No. 12, 1926.
14. ZoBell C. E. Functions of bacteria in the formation and accumulation of petroleum. The Oil Weekly, **120**, No. 12, 1946.

# РОСТ АЗОТОБАКТЕРА И АЗОТФИКСАЦИЯ В УСЛОВИЯХ КИСЛОЙ И ЩЕЛОЧНОЙ СРЕДЫ

*Г. Н. Блинков*

Вопросу о влиянии активной реакции среды на жизнедеятельность азотобактера посвящено много исследований, большинство которых связано с изучением распространения азотобактера в почвах. Ряд авторов приходят к выводу, что отсутствие азотобактера во многих почвах прежде всего объясняется их кислотностью. Эти авторы расходятся только в отношении пределов кислотности, благоприятных для развития азотобактера.

По мнению Lipman [17], азотобактер может существовать в почвах при pH не ниже 6,0 и, по мнению Смалия [10],— при pH не ниже 5,8. Пушкинская-Купленская [9] констатирует, что в окрестностях Игарки азотобактер, внесенный в виде азотогена, сохранил свою жизнедеятельность в течение года, несмотря на то, что pH почвы равен 5,5. Gainey и Fawler [15] считают, что в зависимости от штамма азотобактера нижний предел pH колеблется от 5,5 до 6,0. Burk с сотрудниками [13] выяснил, что на безазотистых средах азотобактер растет при pH не ниже 6,0, но при наличии связанного азота азотобактер растет даже при pH = 4,5. Мишустин с Семенович [7] и с Бахаревой [6] установили, что азотобактер быстро инактивируется при внесении его в почву, имеющую солевое pH около 4—5.

Некоторые исследователи устанавливают для азотобактера не только нижний, но и верхний предел реакции среды: по мнению Fred и Devenport [14], рост азотобактера возможен в пределах pH = 6,6—8,8, и, по мнению Stapp и Ruschmann [18],— в пределах pH = 5,6—9,18. Войткевич и Рунов [5] признают pH важным, но не всегда решающим фактором для распространения азотобактера в почве; к такому же выводу приходит и Сушкина [11].

Ряд исследований посвящен выяснению влияния pH на азотистый обмен азотобактера. Виноградский [3, 4] считает одной из главных причин, обусловливающих выделение аммиака жизнедеятельными клетками азотобактера, щелочную реакцию: в щелочной среде синтезируемый азотобактером аммиак не ассимилируется полностью и часть его выделяется наружу. Сильное влияние щелочной среды на выделение азотобактером аммиака подтверждается также исследованиями Блинкова [1]. Федоров [12] констатирует, что продуктивность азотфиксации азотобактера мало зависит от pH в пределах изученного им диапазона (pH = 5,59—8,75). Блинков [2] выяснил, что pH оказывает большое влияние на интенсивность азотфиксации и рост азотобактера: в слабо щелочной среде эти процессы протекают значительно интенсивнее, чем в кислой среде (при pH = 6,1); при этом интенсивность постепенно повышается в пределах pH = 6,1—7,3, а дальше до pH = 8, остается на достигнутом уровне.

Целью данного исследования являлось выяснение, как совершаются рост и развитие азотобактера и фиксация им молекулярного азота в условиях резко кислой и резко щелочной среды и определение для этих процессов крайних пределов pH среды.

## Экспериментальная часть

Исследования проводились над чистыми культурами Azotobacter chroococcum № 54 и Azotobacter vinelandii (флуоресцирующий), которые были получены из Института микробиологии Академии Наук СССР.

Азотобактер выращивался в чашках Петри на агаровой среде следующего состава: водопроводной воды 1 л, сахарозы 20 г, сернокислого кальция 1 г, сернокислого магния 0,5 г, фосфорнодвукалиевой соли 1 г. Для регулирования pH, вместо фосфорнодвукалиевой соли, употреблялась смесь одно- и двузамещенного фосфорнокислого калия в концентрации $^1/_{15}$ моля. В условиях кислой среды pH регулировался также изменением концентрации агара от 2 до 1%.

Каждая чашка заливалась 30 мл среды. Посев производился суспензией молодой культуры азотобактера, выращенного в пробирках с агаровой средой Омелянского. Засеянные чашки выдерживались в термостате при 27°.

pH сред определялся электрометрически в водных вытяжках из агаровой среды в начале опыта и при очередных анализах. Для этого чашки со средой заливались на 6 часов 3 мл дестиллированной воды (при анализах — после предварительного смывания культуры).

Показателем интенсивности азотфиксации являлось количество азота, накопленного азотобактером за определенный период времени, и показателем продуктивности азотфиксации — количество азота, накопленного на 1 г сахарозы к концу развития азотобактера.

Азот определялся по Кьельдалю в культуре азотобактера после ее смывания в тугоплавкие колбы. Для установления абсолютной азотфиксации азот определялся также в культуре сразу после посева ее в чашки и полученные данные вычитались из данных опытных вариантов. Для проверки, не усваивается ли азотобактером азот, содержащийся в агаре, были проведены определения азота в субстрате до и после выращивания азотобактера; ответ получился отрицательный.

pH и азот определялись в четырехкратной повторности. Средние данные приводятся в табл. 1 и 2. В средах нужная величина pH устанавливалась фосфатным буфером.

Таблица 1

**Влияние кислой среды на интенсивности фиксации азота азотобактером**

| Концентрация агара в % | pH среды | | | Возраст культуры в сутках | Фиксировано азота в мг на 1 г сахарозы | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | вначале | в конце | | | | |
| | | Az. vinelandii | Az. chroococcum | | Az. vinelandii | Az. chroococcum |
| 2 | 7,48 | 7,46 | 7,51 | 2 | 10,58 | 8,86 |
| 2 | 5,72 | 5,68 | 5,70 | 5 | 3,91 | 3,07 |
| 1 | 5,51 | 5,47 | 5,49 | 5 | — | — |

Таблица 2

**Влияние слабо щелочной среды на жизнедеятельность Az. chroococcum**

| Условия опыта | pH | | Фиксировано азота в мг на 1 г сахарозы | |
|---|---|---|---|---|
| | вначале | в конце | за 20 час. | за 5½ сут. |
| Без буферов | 7,46 | 7,38 | 6,35 | 9,29 |
| Смесь фосфатов | 7,55 | 7,59 | 4,31 | 8,58 |
| $K_2HPO_4$ | 8,31 | 8,03 | 4,26 | 8,47 |

Табл. 1 показывает, что при pH = 5,72 фиксация азота еще хорошо выражена, но сильно отстает по сравнению с вариантом, развивавшимся при оптимальной реакции (pH = 7,48) на 1 г сахарозы. При pH = 5,72 за 5 суток накапливается азота у Az. vinelandii — 3,91 и у Az. chroococcum 3,07 мг, а при pH = 7,48 за 2 суток соответственно накапливается

азота 10,58 и 8,86 мг. Задерживающее влияние кислой среды отражается и на развитии азотобактера: при pH = 7,48 культура азотобактера хорошо развивается уже через сутки, а при pH = 5,72 — через двое суток на агаровой поверхности наблюдаются только отдельные колонии, которые разрастаются до сплошной слизи лишь через 5 суток. Еще сильнее сказывается действие кислотности при pH = 5,51: в этом случае на поверхности среды через 5 суток наблюдаются лишь единичные мелкие колонии, состоящие, как показывают наблюдения под микроскопом, из молодых и делящихся клеток азотобактера. Очевидно, что pH = 5,5 это уже нижний предел реакции среды, при котором еще заметно развитие азотобактера.

Табл. 2 показывает, что азотобактер за период своего развития в течение $3^1/_2$ суток не изменяет реакции среды в зоне pH = 7,55 и 7,46, хотя в последнем случае среда даже не забуферена, но значительно подкисляет даже забуференную среду с первоначальным pH = 8,31. Подобное подкисление наблюдается и в опытах с Az. vinelandii как на средах с сахаром, так и на средах с глицерином. Еще сильнее азотобактер подкисляет резко щелочные безбуферные среды с сахаром, что иллюстрируется табл. 3. Из этого факта вытекает, что азотобактер в процессе углеводного обмена в условиях щелочной среды образует органические кислоты.

Углеводный обмен азотобактера изучен слабо, и в литературе по этому вопросу имеются противоречивые указания: Stoklasa [19] обнаружил в качестве промежуточных продуктов уксусную, муравьиную и масляную кислоты, а также этиловый спирт, но Krzemieniwsky [16] и Омелянский [8] указанных продуктов не могли найти.

Для исследования влияния на азотобактер резко щелочной реакции вследствие непригодности для этих целей фосфатных буферов, применялась обычная агаровая среда Омелянского с сахаром или лактатом калия. Разные градации первоначального pH создавались добавлением различных доз KOH — от 0,01 до 0,1 моля. В остальном соблюдалась описанная выше методика.

Результаты опытов на безбуферных щелочных средах с сахаром иллюстрируются табл. 3 и 4.

Таблица 3

**Влияние резко щелочной среды с сахаром на жизнедеятельность Az. vinelandii**

| KOH в молях | pH среды | | | | Возраст культуры в сутках | Фиксировано азота в мг на 1 г сахарозы к моменту анализов | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | вначале | при анализах | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| Контроль | 7,36 | 7,43 | 7,44 | 7,38 | 1, 2, 3 | 4,75 | 11,01 | 11,15 |
| 0,01 | 8,32 | 7,59 | — | — | 2 | 10,75 | — | — |
| 0,02 | 9,18 | 8,01 | 7,94 | — | 1, 3 | 1,88 | 10,87 | — |
| 0,03 | 9,58 | 8,49 | 8,35 | 8,42 | 2, 3, 5 | 4,57 | 9,23 | 10,39 |
| 0,06 | 10,23 | 8,65 | 8,57 | 8,61 | 4, 6, 8 | 4,17 | 8,29 | 8,43 |
| 0,10 | 11,17 | 9,03 | 8,96 | 9,06 | 8, 10, 12 | 2,04 | 6,96 | 7,05 |

Из данных табл. 3 и 4 видно, что азотобактер может развиваться на средах с pH выше 10 и даже 11, но при этом среды подкисляются. Подкисление сред тем значительнее, чем выше первоначальный pH, это особенно ярко иллюстрируется последними вариантами (табл. 3), где мы видим, что pH снижается с 11,17 до 9,06.

Из табл. 4 выясняется, что на среде с первоначальным pH = 10,84

Таблица 4

**Развитие азотобактера и динамика pH на щелочных средах с сахаром**

| Возраст культуры в сутках | Az. chroococcum | | Az. vinelandii | |
|---|---|---|---|---|
| | pH среды | развитие | pH среды | развитие |
| Вначале | 10,84 | — | 10,84 | — |
| 3 | 10,75 | Незаметно . . . . . | 10,79 | Незаметно |
| 4 | 10,36 | „ „ . . . . . | 10,51 | „ „ |
| 6 | 9,46 | Отдельные колонии . . . . . | 9,85 | „ „ |
| 7 | 9,25 | Сплошь жидкая слизь . . . . | 9,44 | Отдельные колонии |
| 8 | 9,12 | Густая слизь . . . . . | 9,08 | Сплошь жидкая слизь |
| 10 | 9,07 | Начало пигментации . . . . . | 9,04 | Густая слизь с сине-зеленой пигментацией |

за первые четыре дня перелом в сторону подкисления лишь только обозначается, но в следующие два-три дня подкисление уже сильно ускоряется: шестидневная культура Az. chroococcum и семидневная культура Az. vinelandii доводят pH среды до 9,4; после этого подкисление снова резко замедляется и прекращается на уровне pH = 9.

С динамикой pH неразрывно связано и развитие азотобактера. Вначале развитие удается установить только путем микроскопирования, при котором можно наблюдать делящиеся и молодые клетки азотобактера. В первые дни эти формы в поле зрения очень редки и обычно имеют величину меньше нормальной, но с течением времени общее количество клеток и количество клеток нормальной величины постепенно возрастают. При наблюдениях невооруженным глазом развитие азотобактера отчетливо обозначается только тогда, когда pH среды спускается до 9,4, который, очевидно, и нужно считать верхним пределом активной реакции среды для заметного развития азотобактера. С появлением первых колоний развитие азотобактера уже происходит быстро и заканчивается в течение двух-трех следующих дней.

Резкая щелочность снижает не только интенсивность роста, но и интенсивность азотфиксации, что вполне понятно, так как рост и азотфиксация неразрывно связаны друг с другом. Зависимость интенсивности азотфиксации от щелочности среды наглядно иллюстрируется данными табл. 3 при сопоставлении друг с другом крайних вариантов опыта; в данном случае за сутки накапливается 4,75 азота при pH = 7,36 и только 2,04 мг за 8 суток при pH = 11,17.

Показателем интенсивности роста и азотфиксации могут служить также сроки окончания процесса азотфиксации. Эти данные согласуются с предыдущими: процесс азотфиксации в слабо щелочной среде завершается уже через 2 суток, а в резко щелочной среде — лишь через 6—10 суток, в зависимости от первоначального pH.

Зависимость интенсивности развития азотбактера от щелочности подтверждается, наконец, и путем микроскопирования: в условиях слабо щелочной среды делящиеся формы клеток азотобактера не встречаются уже через 2 суток, а при pH около 11 они встречаются на протяжении 9 суток.

Для Az. chroococcum перечисленные показатели интенсивности развития дополняются еще наблюдениями за пигментацией, которая начинает проявляться, как только заканчивается развитие азотобактера. Эти данные вполне согласуются со всеми предыдущими: в слабо щелочной среде пигментация обозначается уже на третьи сутки, и при pH около 11 — не раньше, чем на десятые сутки (табл. 4).

Резкая щелочность снижает не только интенсивность, но и продуктивность азотфиксации. Например, Az. vinelandii (табл. 3), закончив свое развитие, накапливает азота на 1 г сахарозы 11,15 мг при pH = 7,36 и только 7,05 мг при первоначальном pH = 11,17.

Результаты опытов с азотобактером на щелочных средах с лактатом калия приводятся в табл. 5.

Таблица 5

**Влияние резко щелочной среды с лактатом калия на жизнедеятельность Az. vinelandii**

| pH среды | | Возраст культуры | Фиксировано азота в мг на 1 г молочной кислоты к моменту анализов | | |
|---|---|---|---|---|---|
| вначале | при последнем анализе | | 1 | 2 | 3 |
| 7,69 | 9,15 | 40 час., 3, 5 сут. | 5,18 | 11,23 | 11,12 |
| 8,11 | 9,28 | То же | 5,26 | 11,17 | — |
| 8,42 | 9,40 | „ „ | 4,29 | 11,26 | — |
| 8,71 | 9,32 | 40 час., 4, 7 сут. | 2,67 | 5,95 | 6,08 |
| 9,07 | 9,39 | 4, 7, 9 сут. | 3,05 | 4,69 | 4,82 |
| 9,18 | 9,42 | 7, 9 сут. | 2,89 | 3,12 | — |

Из табл. 5 видно, что среды с лактатом калия азотобактером подщелачиваются. Это вполне понятно, так как из лактата калия используется только анион молочной кислоты и освобождается катион K, который и вызывает подщелачивание. Следует подчеркнуть то обстоятельство, что реакция среды, резко различающаяся в разных вариантах в начале опыта, более или менее выравнивается к концу опыта. Само собой разумеется, что это возможно только при неодинаковом использовании лактата калия: более полном в вариантах опыта с первоначально слабой щелочностью и менее полном — в вариантах, имеющих резкую щелочность уже в начале опыта.

Совершенно очевидно, что конечный pH среды, при котором приостанавливается развитие азотобактера, несмотря на наличие энергетического материала, может рассматриваться как верхний предел реакции среды для заметной жизнедеятельности азотобактера. Судя по данным опытов, таким пределом для Az. vinelandii (а также и для Az. chroococcum) является pH = 9,4. Этот вывод подтверждается и тем, что тот же pH = 9,4 является верхним пределом для заметного развития азотобактера и на средах с сахаром (табл. 4).

В наших опытах с лактатом калия были варианты и с первоначальным pH выше 9,4. Развитие культуры азотобактера на них было незаметно, и pH среды не менялся, почему они и не приводятся в таблицах. Однако при микроскопировании и в этих случаях изредка встречались активные клетки азотобактера подобно тому, как это наблюдалось на резко щелочных средах с сахаром. Это лишний раз подтверждает, что азотобактер, хотя и в очень слабой степени, развивается и при pH выше 9,4. В условиях резкой щелочности на лактате калия, как и на сахаре, преобладают клетки, по величине меньше нормальной.

Как и на средах с сахаром, на средах с лактатом калия высокая щелочность резко снижает интенсивность и продуктивность азотофиксации: Az. vinelandii за 40 часов накапливает азота 5,18 мг при pH = 7,69 и только 2,67 мг — при pH = 8,71; азотфиксация заканчивается после накопления 11,23 мг азота при pH = 7,69 и только 3,12 — при pH = 9,18.

Из данных табл. 5 видно, что при первоначальном — pH = 7,69 и 8,11 интенсивность азотфиксации одинакова: в этих случаях за 40 часов накапливается азота 5,18 и 5,26 мг; но при pH = 8,42 интенсивность азотфиксации уже несколько снижается, так как за те же 40 часов накапливается азота только 4,29 мг. Отсюда следует вывод, что зона оптимальной реакции среды для жизнедеятельности азотобактера простирается за пределы pH = 8,1.

Опыты по выяснению влияния щелочных сред проводились всегда параллельно с Az. vinelandii флуоресцирующим штаммом, Az. chroococcum и еще с Az. vinelandii нефлуоресцирующим и притом не только на агаровых, но и на кремнекислых средах. В качестве энергетического материала, вместо сахара, применялся еще глицерин и, вместо лактата калия — лимоннокислый натр. Во всех этих случаях получены данные, аналогичные уже приведенным.

## Выводы

1. Активная реакция среды, совместимая с ростом азотобактера и фиксации им молекулярного азота, простирается по крайней мере с pH = 5,5 до pH выше 11,0.

2. Интенсивность роста и азотфиксация в указанных пределах весьма неравномерны: чрезвычайно слабы у крайних пределов pH, уже хорошо заметны около pH = 5,7 и 9,4; в наилучшей степени они, вероятно, проявляются в интервале от pH = 7,3 и по крайней мере до pH = 8,1.

3. На щелочных средах с сахаром азотобактер, за счет органических кислот, образующихся в процессе углеводного обмена, в значительной мере снижает pH и тем самым создает для себя более благоприятную реакцию среды, но при этом он частично лишается энергетического материала, что приводит к снижению продуктивности азотфиксации.

4. На средах с солями органических кислот резко щелочная реакция тоже снижает продуктивность азотфиксации, но оказывает на этот процесс уже непосредственное действие: в этих случаях азотобактер еще больше повышает щелочность и доводит pH до предела, препятствующего его дальнейшей жизнедеятльности.

Томский государственный педагогический институт

*Получено 1. III. 1950 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Блинков Г. Н. О выделении аммиака азотобактером. Микробиология, XVI, 113, 1947.
2. Блинков Г. Н. Влияние реакции среды на интенсивность азотфиксации и рост азотобактера. Микробиология, XVII, 49, 1948.
3. Виноградский С. Н. Метод почвенной микробиологии, примененный при изучении азотобактера и нитрифицирующих бактерий. Успехи биологич. химии, вып. XIII, 18, 1937.
4. Виноградский С. Н. Sur la synthèse de l'ammoniaque par les Azotobacter. Ann. Inst. Past., 48, 269, 1932.
5. Войткевич А. Ф. и Рунов Е. В. О распространении азотобактера в почве. Вестник бактериолого-агрономич. станции НКЗ, № 25, стр. 58, 1928.
6. Мишустин Е. Н. и Бахарева З. И. Почвенная кислотность как фактор, определяющий появление в почве неактивного азотобактера. Микробиология, VIII, 1063, 1939.
7. Мишустин Е. Н. и Семенович М. И. Почвенная кислотность как фактор, определяющий появление в почве неактивного азотобактера. Микробиология, VIII, 19, 1939.
8. Омелянский В. Л. Связывание атмосферного азота почвенными микроорганизмами, Петроград, 1923.
9. Пушкинская-Купленская О. Микробиологическая характеристика почв района Игарки. Тр. Научно-иссл. ин-та полярного земледелия животноводства и промыслового хозяйства. Серия растениеводч., вып. 1, стр. 89, 1940

10. Смалий В. Развитие азотобактера в зависимости от активной кислотности (pH) почвы при применении препарата азотобактерина. Микробиологич. журн. Акад. Наук УССР, **6**, 127, 1939.
11. Сушкина Н. Н. Эколого-географическое распространение азотобактера в почвах СССР, 1949.
12. Федоров М. В. Биологическая фиксация азота атмосферы. Сельхозгиз, 1948.
13. Burk D., Lineweaver H. and Horner C. The specific influence of acidity on the mechanism of nitrogen fixation by Azotobacter. J. Bact., **27**, 325, 1934.
14. Fred and Davenport. Influence of reaction on nitrogen assimilating Bacteria. J. Agr. Res., **14**, No. 8, 317, 1918.
15. Gainey P. L., and Fawler E. Growth curves of Azotobacter at different pH levels. J. Arg. Res., **70**, No 7, 219, 1945.
16. Krzemieniewsky S. Physiologische Untersuchungen über Azotobacter Chroococcum. Bull. Int. de l'Acad. des Sci. de Cracowie, 746, 1907.
17. Lipman J. G. The effect of the reaction of the culture medium on the fixation of nitrogen by members of the Azotobacter group. New Jersey State Agr. Exp. Sta., Annal Rpt., P. 262, 1904.
18. Stapp C. and Ruschmann G. Zur Biologie von Azotobacter. Arb. Biolog. Reichsanst Land und Forstwirtsch., **13**, 305, 1924.
19. Stoklasa J. Beiträge zur Kenntnis der chemischen Vorgänge bei der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch Azotobacter und Radiobacter. Ctbl. Bakt., II Abt., **21**, 484, 1908.

# ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВ ИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

*Н. И. Гамова-Каюкова*

Одним из решающих факторов в успешном выделении микроорганизмов из пищевых продуктов является выбор подходящей питательной среды.

В природных условиях и в пищевых продуктах та или иная группа микроорганизмов почти никогда не встречается в чистом виде. Поэтому выделение определенных микробных представителей связано с рядом трудностей, которые легко можно преодолеть, лишь зная биологические особенности изучаемого микроба.

Виноградский в свое время блестяще разрешил эту задачу, предложив выделение азотобактера, нитрофицирующих и других бактерий производить на элективных средах [1]. Благодаря свойствам элективных сред удалось освободиться от «сорных видов».

В настоящее время в микробиологии широко практикуется применение избирательных сред для выделений различных групп микроорганизмов как в практической работе, так и в научных изысканиях.

Однако за последние годы работы по физиологии питания микроорганизмов вносят коррективы в практику выделения культур микроорганизмов. Имшенецкий для выделения анаэробных целлюлозных и десульфирующих бактерий предлагает применять оптимальные питательные среды, благодаря чему удается значительно повысить титр выделяемости этих микробов [3, 4].

Перед нами стояла задача подобрать такую элективную среду для выделения стафилококка из пищевых продуктов, которая обеспечивала бы максимальную выделяемость стафилококков как для контрольных анализов пищевых продуктов, так и для случаев пищевых токсикоинфекций.

Неприхотливые в отношении роста на питательных средах и резистентные к действию физических и химических факторов стафилококки могут развиваться на различных пищевых продуктах, которые могут инфицироваться человеком или животным. Такие продукты могут быть опасными для здоровья человека.

Наиболее часто пищевые отравления стафилококкового происхождения наблюдаются в результате употребления молока, пирожных и тортов с кремом, а также мороженого. Описаны случаи отравления сыром и мясом. Туржецкий указывает на отравления консервами «треска в масле». Экспериментальным путем ему удалось обнаружить живых стафилококков в консервах после стерилизации [6].

Сравнительно редкие случаи выделения стафилококков при пищевых отравлениях в нашей практике привели нас к выводам, что рекомендуемые питательные среды для выделения стафилококков обладают существенными недостатками [5]. Можно было сделать предположение, что вследствие применения сред, не угнетающих развития посторонней микрофлоры, создаются неблагоприятные условия для выделения стафилококков. Если представить себе, что посев исследуемого продукта, в котором может находиться смесь стафилококков со споровыми палочками или с кишечной палочкой, производится на МПБ или на МПА

с глюкозой, то может случиться, что при росте микробов перевес окажется на стороне кишечной палочки, хотя бы вследствие того, что продолжительность генерации у стафилококков 25—30 минут, а у кишечной палочки и других палочковидных форм менее чем 15 минут. Могут получить перевес и другие микробы — антагонисты.

Между тем Кохом (Koch, [8]), Чистовичем и Бартошевичем [7] было установлено, что культуры золотистого стафилококка устойчивы к высоким концентрациям хлористого натрия (2,0—7,5%).

Нами [2] были проверены рекомендуемые концентрации NaCl на культурах Staphylococcus aureus различного происхождения. Добавление NaCl производилось к питательным агарам и питательным бульонам, приготовленным разными способами. Посевы показали, что для выделения культур St. aureus МПБ и МПА, приготовленные по обычной прописи из мяса с добавлением высоких концентраций NaCl, являются лучшими средами по сравнению с сухими питательным бульоном и питательным агаром. Худшие результаты были получены и при посевах культур золотистого стафилококка на питательный агар и бульон из мяса или плаценты, приготовленных по способу Хоттингера.

Введение МПБ и МПА с повышенным содержанием NaCl (6—10%) в практику лабораторного исследования повысило выделяемость культур золотистого стафилококка из пищевых продуктов, направляемых на исследование в случаях пищевых токсикоинфекций.

Однако длительность бактериологического анализа (до 5 суток) и отсутствие явно дифференциальных признаков для энтеротоксических культур стафилококков заставили предпринять ряд поисков по подбору дифференциально-ингибиторной среды для выделения стафилококков из смешанных культур.

Общепринято считать, что патогенные стафилококки при выращивании их на среде с бромтимолблау изменяют цвет среды из синего на желтый. От первого же нашего варианта дифференциально-ингибиторной среды — МПА с NaCl и с бромтимолблау — пришлось отказаться, так как введение индикатора резко усилило угнетающее действие NaCl в среде.

Дальнейшие поиски привели нас к более перспективной среде — кровяному агару с повышенным содержанием NaCl, в котором сочетается дифференциальный признак для стафилококка совместно с угнетающим действием NaCl на другие виды бактерий.

Хорошо известно, что патогенные стафилококки образуют гемолизины. Действие стафилококкового гемолизина связано с протеолизом белковых веществ полупроницаемой оболочки красных кровяных телец. Повреждение стромы эритроцитов освобождает гемоглобин, который диффундирует в окружающую среду, при этом кровь или взвесь эритроцитов просветляется. На кровяном агаре образуются прозрачные ореолы вокруг выросших колоний стафилококков. Этот признак используется совместно с рядом других признаков при дифференциации энтеротоксических культур стафилококков. Мы этот признак решили использовать как дифференциальный для отбора гемолитических колоний стафилококков при прямом посеве на чашках.

Состав предложенной и проверенной на чистых культурах и в условиях практической работы среды следующий:

I. К МПА, приготовленному по обычной прописи, с pH, равным 7,2—7,4, добавляется 6—7% NaCl. Стерилизация при 120° в течение 15 минут.

2. К расплавленному и остуженному до 45° агару, содержащему NaCl, ex tempore добавляется цитратная человеческая кровь или бараньи эритроциты по общепринятому способу. Затем после тщательного перемешивания среда выливается в теплые чашки. На застывшую поверхность такого агара производится посев из соответствующих раз-

ведений исследуемого продукта. Выращивание осуществляется при 37° в течение 24—48 часов. Одновременно ставится контрольная чашка с незасеянной средой. Даже при густых посевах легко выбрать колонии гемолизирующих стафилококков среди других колоний микробов, устойчивых к действию NaCl.

При испытании различных концентраций NaCl в кровяном агаре было выявлено, что 10% NaCl тормозит рост стафилококков. При наличии в среде 5—6—7% NaCl не наблюдалось сколько-нибудь сильного угнетающего действия ни на рост стафилококков, ни на гемолиз. Посевы различных культур стафилококков дали вместе с тем возможность оценить и разную степень гемолитической активности у изучаемых культур.

При испытании роста других бактерий на агаре с 6—7% NaCl выявилось, что на нем не росли следующие виды бактерий: Bact. coli, Bact. aerogenes, Bac. mycoides. Культура Bact. proteus vulgaris образовывала изолированные колонии.

Введение указанной среды для выделения St. aureus в практику бактериологического анализа сократило сроки исследования.

Была сделана также попытка заменить дорогостоящую основу среды — мясо-пептонный агар пептонным агаром с добавлением глюкозы и дрожжевого автолизата. Однако, несмотря на хороший рост стафилококка и наличие гемолиза на пептонно-кровяном агаре с 6—7% NaCl, мы не решились его рекомендовать для практических целей из-за отсутствия достаточно хорошей пигментации колоний.

## Выводы

1. Предлагается ингибиторно-дифференциальная среда — кровяной агар с NaCl для выделения золотистого стафилококка из смешанных культур (МПА + 6—7% NaCl + 5% цитратной крови доноров или бараньих эритроцитов).

2. На кровяном агаре с 6—7% NaCl задерживается рост ряда бактерий: Bact. coli, Bact. aerogenes, Bac. mycoides. Bact. proteus vulgaris на этой среде не «роится».

3. Введение дифференциально-ингибиторного агара в практику лабораторного исследования повышает выделяемость золотистого стафилококка и сокращает сроки анализа. Через 24—48 часов после посева можно гемолизирующие колонии St. aureus легко отобрать из смеси и выделить в чистой культуре.

Центральная санитарно-гигиеническая лаборатория г. Москвы

*Получено 20.III.1950 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградский С. Н. (Winogradsky S.) La microbiologie oecologique. Ses principes. Son procédé. 1-ier Congr. des microbiologistes de Langue française à Paris. Rapport présenté de 28 oct., 1938.
2. Гамова-Каюкова Н. И. и Шустова Л. Н. К методике выделения стафилококков из пищевых продуктов. Санитария и гигиена. № 9, 33, 1950.
3. Имшенецкий А. А. Оптимальные питательные среды для анаэробных целлюлозных бактерий. Микробиология, XVIII, вып. 3, 1949.
4. Имшенецкий А. А. Оптимальные питательные среды для десульфирующих бактерий. Микробиология, XVIII, вып. 4, 1949.
5. Методика бактериологических исследований при пищевых отравлениях. Министерство здравоохранения, Медгиз, Москва — Ленинград, 1948.
6. Туржецкий К. И. Выработка стафилококками токсина на пищевых продуктах. Гигиена и санитария, № 6, 1949.
7. Чистович Г. Н. и Бартошевич Н. С. Элективные среды для выделения стафилококков. Журн. микроб., эпидем. и иммуноб., № 9, 1948.
8. Koch Fr., Elektivnährboden für Staphylocockken. Ctbl. Bakt., Abt. I, 49, 121, 1942.

# РЕАКЦИЯ CYPHOMANDRA BETACEA НА ВИРУС МОЗАИКИ ТАБАКА И СТРИКА

*М. И. Гольдин* и *М. З. Назарова*

Для получения методом вегетативной гибридизации новых форм томатов, устойчивых к вирусу мозаики томатов и к стрику, мы привлекли различные виды пасленовых. В настоящей статье сообщаются данные по устойчивости Cyphomandra betacea к вирусу мозаики табака и к стрику.

В сводной работе Holmes [4] цифомандра описана как вид, не восприимчивый к вирусу мозаики табака. Также в работе Chamberlain [3] утверждается, что цифомандра совершенно не поражается этим вирусом. Однако, обследовав цифомандру в теплицах Института зернового хозяйства [1], мы обнаружили у 30 растений из 75 явную мозаичность. При микроскопическом изучении во всех случаях, за исключением одного, в клетках мозаичных растений были обнаружены кристаллы Ивановского, типичные для вируса мозаики табака. Эти данные были подтверждены также биологической пробой на листочках Nicotiana glutinosa. На различных экземплярах цифомандры мы обнаружили зеленую или желтую мозаику, сопровождающуюся уродством листьев а также своеобразные выросты на нижней поверхности листа (enation) (рисунок).

Рис. 1. Выросты на нижней поверхности листа мозаичной цифомандры

Эти факты свидетельствуют о том, что цифомандра поражается различными штаммами вируса мозаики табака. Так как исследованные нами растения находились уже несколько лет в экспериментальной теплице, то они могли быть использованы в различных опытах, в том числе и в качестве подвоя, привоем же случайно могли оказаться томаты, зараженные вирусом мозаики табака. В таком случае заражение могло произойти в результате прививки. Может ли цифомандра инфицироваться вирусом мозаики табака при заражении соком, подобно тому как это происходит у томатов?

Для выяснения этого вопроса было взято в опыт шесть молодых цифомандр, выращенных из семян. Предварительно методом биологической пробы было установлено, что все эти растения не содержат вируса мозаики табака. Затем три листа с каждого растения были заражены

[1] Приношу благодарность дирекции Института зернового хозяйства за любезно предоставленный нам материал.

потиранием соком мозаичного томата. Через месяц три из шести цифомандр оказались мозаичными. В листьях были обнаружены кристаллы Ивановского. Биологическая проба на листьях N. glutinosa также была положительная. Три остальные цифомандры, которые оставались здоровыми, после повторного заражения также инфицировались. Таким образом, не только путем прививки, но и при заражении соком цифомандра может быть заражена вирусом мозаики табака, правда, не с такой легкостью, как томаты или табаки.

В теплице находились еще 24 цифомандры, выращенные из семян. Эти растения не использовались ни для прививки, ни для опытов с заражением соком. В конце лета у 13 из них появилась мозаика. Очевидно, заражение произошло случайно в процессе ухода за растениями. Эти данные также подтверждают возможность заражения цифомандры вирусом мозаики табака, не только прививкой, но и соком.

Наряду с этим мы обнаружили следующее: 7 из 50 цифомандр, на которых были привиты томаты, были здоровы, хотя привой был сильно поражен мозаикой и стриком (табл. 1).

Таблица 1

| № растения | Наличие включений | | Внешние симптомы | | Число некрозов на половинке листа N. glutinosa | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | подвой | привой | подвой | привой | подвой | привой |
| 208 | Нет | Много | Нет | Мозаика и некрозы | 0 | 10 |
| 297 | „ | Среднее количество | „ | Мозаика | 0 | 6 |
| 88 | „ | Много | „ | „ | 0 | 23 |
| 172 | „ | „ | „ | „ | 0 | 17 |
| 348 | „ | Среднее количество | „ | Мозаика и некрозы | 0 | 8 |
| 261 | „ | Много | „ | Мозаика | 0 | 14 |
| 290 | „ | „ | „ | „ | 0 | 4 |

Примечание. Учет производился через два месяца после прививки.

Таким образом, несмотря на возможность заражения соком, в ряде случаев не удается заразить цифомандру вирусом мозаики табака даже путем прививки. Причина этого явления остается пока невыясненной.

Сотрудник Института зернового хозяйства Крыжановский, основываясь на собственных наблюдениях, полагает, что это обстоятельство связано с определенной стадией развития цифомандры.

Принимая во внимание все эти данные, мы можем говорить лишь об относительной устойчивости цифомандры к вирусу мозаики табака, вопреки положениям, выдвинутым Холмсом и Чемберленом.

Ранее мы выяснили [1], что различные сорта петуньи реагируют на вирус мозаики табака некротической реакцией, в то время как в литературе господствовало мнение, что этот вирус вызывает у петуньи только мозаику.

В 1933—1934 гг. Рыжковым с сотрудниками [2] было установлено, что вирус табачной мозаики № 1 вызывает явления нитевидности и папоротниковидности листьев у помидоров. Эта способность ранее приписывалась лишь огуречному вирусу.

Полученный нами материал в отношении цифомандры дает основание поставить вопрос о необходимости ревизии общепринятых положений о действии этого классического вируса на различные виды пасленовых. Нас интересовал также вопрос о возможности повышения устойчивости

томатов к вирусу табачной мозаики путем вегетативной гибридизации. Для выяснения этого мы исследовали вегетативные гибриды Lycopersicon esculentum/Cyphom. betacea, полученные в Институте зернового хозяйства. Семенное поколение этих гибридов $F_3$ по внешним признакам и по химическому составу резко отличалось от исходной формы. Эти растения были изучены нами в отношении вируса мозаики табака. Из 30 кустов новой формы томатов, полученных в результате вегетативной гибридизации с цифомандрой, 27% оказались зараженными вирусом мозаики табака (несколько из них — стриком) в результате случайных заражений. Из 10 гибридов, зараженных нами искусственно соком мозаичных томатов, заразились все 10. Следовательно, эти гибриды не приобрели даже относительной устойчивости к вирусу мозаики табака.

## Выводы

1. Наши наблюдения и опыты показывают, что, вопреки литературным данным, Cyphomandra betacea поражается вирусом мозаики табака, обнаруживая симптомы общей инфекции (мозаичность, уродство листьев, наличие включений).

2. Цифомандра может быть заражена различными штаммами вируса мозаики табака.

3. Испытанные нами вегетативные гибриды Lycopersicon esculentum/Cyphomandra betacea не приобрели даже относительной устойчивости к вирусу мозаики табака (или томатов).

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 24.II.1950 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдин М. О реакции петуньи на вирус мозаики помидор. Микробиология, XVII, 290, 1948.
2. Рыжков В., Михайлова П. и Пивоварова Р. Вирусные болезни пасленовых. Сборник «Вирусные болезни растений». 113, М., 1936.
3. Chamberlain E. Tomato necrosis. A component of severe streak of Tomatoes. New Zealand. J. Sci. Techn., A, **22**, 186, 1940.
4. Holmes F. A comparison of the experimental host ranges of tobacco — etch and tobacco-mosaic viruses. Phytopathology, **36**, 643, 1946.

# ПРИБОР ДЛЯ ДВОЙНОЙ МЕМБРАННОЙ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

*Л. А. Потков*

В настоящее время для определения коли-титра применяется бродильный метод или метод определения коли-индекса посредством фильтрации воды через мембранные ультрафильтры диаметром в 35 мм. Как известно, бродильный метод отличается громоздкостью, трудоемкостью и лишь относительной точностью. Что касается исследования при помощи мембранных фильтров, то принципиально этот метод следовало бы считать наиболее совершенным, если бы работа не осложнялась слишком маленьким диаметром ультрафильтров (равным 35 мм) и одноступенчатой фильтрацией.

Небольшой диаметр ультрафильтров приемлем только для минимальных количеств воды, например 10 мл, с незначительным содержанием микробов. Если же приходится фильтровать 100—200 мл и более, то такие количества необходимо дробить на ряд мелких объемов и фильтровать по 25—50 мл. После фильтрации через ультрафильтры малого диаметра последние накладываются на питательную среду по четыре на каждую чашку. Подсчет на малых ультрафильтрах выросших колоний и их выделение в случае надобности возможны только в тех случаях, когда вода или другая исследуемая жидкость содержат незначительное количество бактерий и взвешенных частиц. В противном случае, даже в результате фильтрации 25—50 мл на поверхности ультрафильтра вырастет такое громадное количество колоний, что они не поддаются ни учету, ни выделению, в особенности, если на поверхности ультрафильтра образуется большой осадок взвешенных частиц, маскирующий колонии бактерий.

Чтобы устранить описанные недостатки, мы предложили ультрафильтры большого диаметра в 87 мм, а для исследования жидкостей с значительным количеством взвешенных частиц предварительную фильтрацию через крупнопористые фильтры.

Ультрафильтр диаметром в 87 мм при накладывании на чашку Петри (с плотной средой) стандартного размера в 100 мм заполняет фактически всю полезную площадь чашки Петри, оставляя по окружности свободный промежуток — всего около 6 мм, необходимый для правильного накладывания ультрафильтра (без образования пузырьков воздуха) на поверхность плотной среды и возможности свободно снимать с нее проросший ультрафильтр.

Диаметр 87 мм увеличивает площадь ультрафильтра в 6 раз по сравнению с площадью ультрафильтров в 35 мм, применяемых в настоящее время. Следовательно, мы производим как бы одновременную фильтрацию через шесть маленьких ультрафильтров. Таким образом, если малых ультрафильтров мы можем уложить на одной чашке максимум четыре, то, накладывая на чашку Петри один большой ультрафильтр, мы фактически получаем рост колоний не на четырех, а на шести ультрафильтрах, т. е. на 50% больше. Кроме того, на большом ультрафильтре значительно облегчается подсчет и выделение колоний. Большое количество скученных и слившихся колоний на малом ультрафильтре не дает таких преимуществ.

Второй недостаток применяемого ныне метода одноступенчатой ультрафильтрации — это образование осадка взвешенных частиц на поверхности ультрафильтра, мешающего распознаванию, выделению и подсчету колоний, выросших на поверхности ультрафильтра. Такой осадок образуется обычно при фильтрации неочищенных вод из естественных водоемов и таких безалкогольных напитков, как квас, морс и др., содержащих взвешенные частицы. Для устранения этого недостатка мы предложили

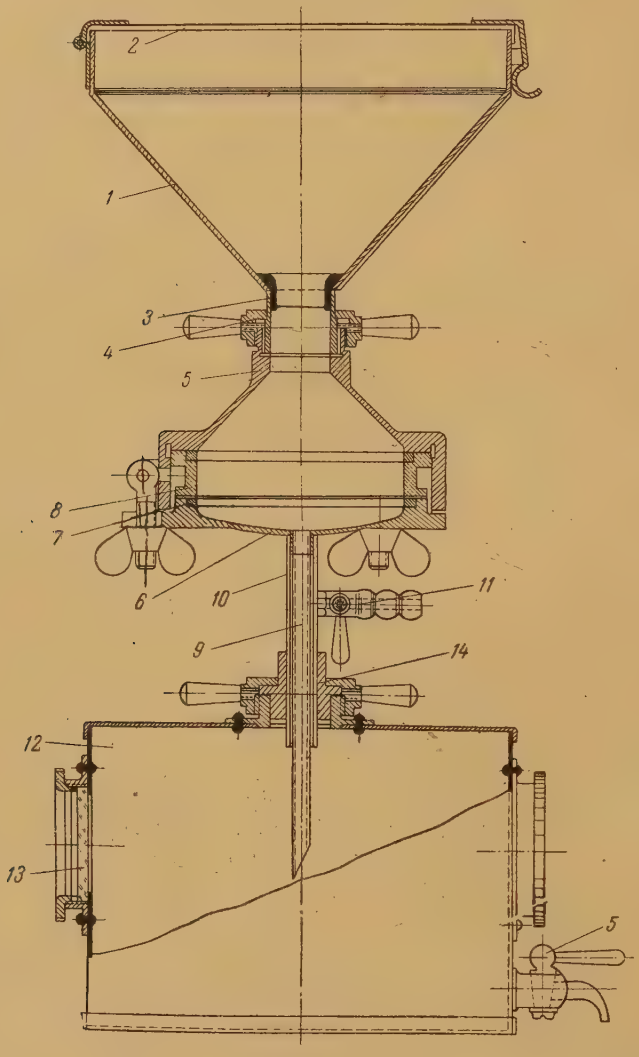



Рис. 1. Прибор для двойной мембранной ультрафильтрации

*1* — бункерная воронка; *2* — крышка воронки; *3* — конусный переход; *4* — фасонная гайка; *5* — воронкообразная муфта; *6* — нижняя воронка; *7* — рамка с сеткой; *8* — цилиндр-кольцо; *9* — внутренняя трубка (водосточная); *10* — наружная трубка (вакуумная); *11* — вакуумный кран; *12* — приемник; *13* — смотровое оконце; *14* — фасонная гайка; *15* — спускной кран

(в 1936 г.) одномоментную двуступенчатую фильтрацию, причем верхний фильтр крупнопористый был нами впервые изготовлен в 1936 г. с таким расчетом, чтобы через верхний фильтр, названный нами «предварительным» или «префильтром», проходили бактерии тифозно-кишечной группы, но задерживались взвешенные частицы. Вода, пройдя через префильтр и очистившись от взвешенных частиц, гораздо легче профиль-

тровывается через основной ультрафильтр № 3, на котором осевшие в результате ультрафильтрации бактерии прорастают и образуют чистые колонии, не замаскированные налетом взвешенных частиц.

Существующая ныне фабрика мембранных ультрафильтров стала готовить крупнопористые мембранные фильтры, но для улавливания планктона и для исследований на яйца глист. Мы пытались использовать эти так называемые планктонные фильтры вместо наших префильтров, но, к сожалению, ряд проведенных опытов не дал удовлетворительных результатов, так как планктонные фильтры отличаются весьма неравномерной пористостью. В силу этого недостатка такой фильтр, используемый в качестве префильтра, задерживает на больших участках не

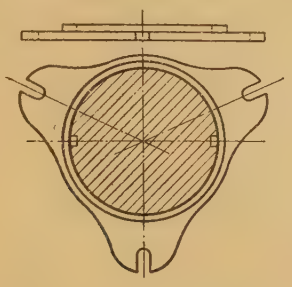


**Рис. 2. Столик нижней воронки с опорной сеткой**

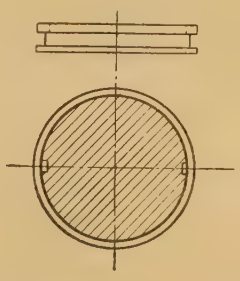


**Рис. 3. Верхний плоский цилиндр-кольцо с опорной сеткой**

только взвешенные частицы, но и бактерий, которые должны были пройти и осесть на поверхности нижнего плотного ультрафильтра № 3. Поэтому соответствующие участки нижнего ультрафильтра оказываются стерильными. Этот чисто технический дефект производства ультрафильтров не может порочить метода двойной фильтрации при бактериологическом исследовании воды. Необходимость и целесообразность такого метода должны послужить стимулом для руководителей фабрики мембранных ультрафильтров для освоения производства префильтров, удовлетворяющих соответствующим техническим требованиям.

Предложенный нами метод двойной мембранной ультрафильтрации через ультрафильтры большого диаметра [1] может осуществляться с помощью прибора новой конструкции. На рис. 1 видно, что вновь сконструированный нами прибор состоит из следующих основных частей: бункерной воронки *1* с крышкой *2*, которая конусным переходом *3* и фасонной гайкой *4* скрепляется с воронкообразной муфтой *5* фильтрующей части прибора — среднего узла.

Средний узел состоит из следующих главных деталей:— нижней воронки, в которую вставляется опорная рамка с сеткой (рис. 1, *6* и рис. 2). На эту сетку накладывается в процессе работы основной мембранный ультрафильтр № 3. На нижнюю воронку с опорной рамкой и сеткой накладывается двойное кольцо в виде плоского цилиндра, в верхнюю часть которого вставляется рамка с сеткой для префильтра (рис. 1, *8* и рис. 3). Весь средний узел закрывается целиком воронкообразной муфтой (рис. 1, *5*), которая связана, как указано выше, верхней своей частью с бункерной воронкой (рис. 1, *1*), а внизу накидными болтами с барашками скрепляется наглухо с нижней воронкой (рис. 1, *6* и рис. 2). Последняя заканчивается двойной трубкой. Внутренняя трубка (рис. 1, *9*) служит для стока фильтруемой жидкости; наружная трубка (рис. 1, *10*) — вакуумная, служит для создания вакуума через вакуумный кран

[1] См. нашу диссертацию от 1946 г. «Методы бактериологического исследования питьевых и сточных вод на присутствие тифозно-паратифозной группы». (Центр. мед. библ. Минист. здравоохр.).

(рис. *11*) в приемнике (рис. 1, *12*). Вакуумный кран дает возможность не затрачивать энергию на беспрерывную откачку воздуха в течение всей фильтрации, а после создания вакуума вакуумный кран перекрывается, после чего откачку воздуха можно прекратить, так как вакуум, созданный в приемнике, будет сохранен.

По техническим причинам нами были проведены пока только ориентировочные опыты по ультрафильтрации воды, зараженной смесью бактерий, состоящей из брюшнотифозной, паратифозной и кишечной палочек, а также протея.

Ультрафильтрация производилась в модели прибора нашей конструкции через ультрафильтр № 3. Соотношение культур было следующее: в 250 мл стерильной водопроводной воды вносилось примерно по 15 микробных клеток возбудителя брюшного тифа и паратифа В и

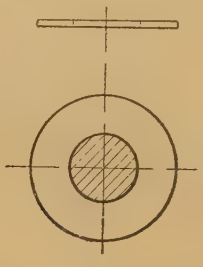


Рис. 4. Нижний вкладыш с малой опорной сеткой

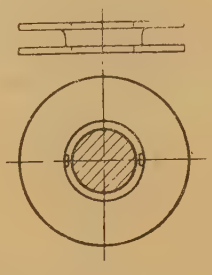


Рис. 5. Верхнее опорное кольцо с малой опорной съемной сеткой

по 1000 микробных клеток кишечной палочки и вульгарного протея (по оптическому стандарту). После фильтрации этой искусственно зараженной воды через мембранные ультрафильтры № 3, последние накладывались на бисмут-сульфитный агар в модификации Минкевича. Через 36 часов инкубирования при 37° было выделено пять колоний палочки брюшного тифа. Кроме того, выросло незначительное количество желтовато-зеленоватых и коричнево-зеленых колоний сапрофитной микрофлоры (кишечной палочки и вульгарного протея). Через 48 часов количество и размеры всех колоний значительно увеличились. Вторичный просмотр чашек дал возможность выделить еще три колонии бактерий брюшного тифа и восемь колоний бактерий паратифа В. Приведенные опыты производились через ультрафильтры диаметром 72 мм.

В последующих моделях диаметр ультрафильтров был увеличен до 82 мм, а окончательный вариант имеет диаметр максимальный — 87 мм по отношению к существующим стандартным чашкам Петри диаметром в 100 мм.

Возможны случаи, когда нет надобности использовать большие площади фильтрации, предлагаемые нами, и можно ограничиться маленькими фильтратами — в 35 мм.

Для таких случаев в нашем приборе предусмотрены особые вкладыши. При этом вынимается нижняя сетка и на ее место вкладывается пластинка, в центре которой имеется сетка диаметром в 30 мм (рис. 4). Для двойной фильтрации средний цилиндр с сеткой большого диаметра заменяется другим цилиндром с сеткой малого диаметра в 30 мм (рис. 5).

Все части нашего прибора изготовляются из нержавеющей стали или из латуни и в последнем случае хромируются внутри и снаружи. Благодаря этому весь прибор поддается чрезвычайно несложному способу стерилизации путем фламбирования всех частей.

Данный прибор отличается портативностью. Он помещается в фут-

ляр, в котором находится также все необходимое для производства исследований вне лаборатории, на месте забора пробы, а именно: вакуум-насос Шинца (велосипедного типа), набор для кипячения ультрафильтров (круглый металлический стерилизатор с крышкой и спиртовка на складном треножнике), пинцет и коробка с ультрафильтрами.

Несколько слов о предлагаемом нами стерилизаторе.

Это круглая алюминиевая баня диаметром 120 мм и высотой 90 мм с крышкой, снабженной деревянной шишечкой (рис. 6). Внутри бани на $^2/_3$ ее высоты, на маленьких выступах — кронштейнах — вставлен диск с большим количеством круглых отверстий (85—90) диаметром в 5 мм. Диск снабжен откидным коромыслом, при помощи которого он

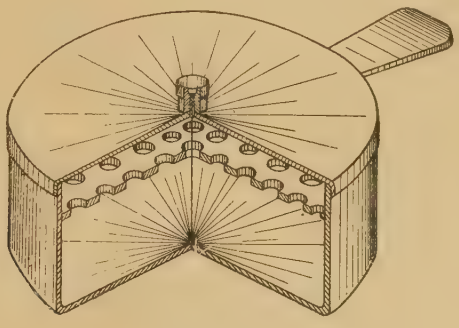


Рис. 6. Стерилизатор

вынимается и вставляется в баню. Данная баня предназначается для одновременной стерилизации ультрафильтров и опорных сеток фильтровального прибора путем кипячения, так как опорную сетку фламбировать не следует ввиду опасности ее распаять.

Чашки Петри с соответствующей плотной средой помещаются в особый пенал, который вместе с стерильными склянками для проб исследуемой жидкости и складным батометром конструкции Дианової и Ворошиловой [2] находится в другом футляре.

Описанные прибор и метод дадут возможность осуществлять требуемые исследования также и в экспедиционных условиях, значительно облегчая производство анализов и повышая их качество, так как при этом устраняются разрывы во времени между моментом взятия проб и их исследованием.

## Выводы

1. Применение предлагаемого прибора значительно облегчает технику бактериологического исследования больших количеств воды, должно повысить высеваемость патогенных бактерий кишечной группы при бактериологических исследованиях воды и облегчить и уточнить бактериологическое исследование безалкогольных напитков с большим количеством взвешенных частиц.

2. Предлагаемый метод определения коли-индекса является в известном смысле комбинацией метода концентрации бактерий на мембранных ультрафильтрах и метода Мармана, но в значительно более простой и эффективной модификации.

Центральный научно-исследовательский
санитарный институт им. Эрисмана
Москва

*Получено 20. II. 1950 г.*

[2] Батометр конструкции Е. В. Дианової и А. А. Ворошиловой применяется в нескольких институтах. Его описание опубликовано в Информационных материалах Института им. Эрисмана в 1950 г.

# НИТРАГИН

(Обзор за 1944—1950 гг.)

*К. И. Рудаков*

Азотные удобрения более дефицитны и дороги, чем остальные. В то же время, как это давно известно, бобовые растения прекрасно обходятся без связанного азота, усваивая из воздуха совместно с клубеньковыми бактериями до 300 кг элементарного азота на 1 га (Прянишников, 1945). Остающиеся после уборки бобовых растительные остатки (корни, надземные части), разлагаясь в почве, доставляют связанный азот для корневого питания последующих небобовых сельскохозяйственных культур.

Бобовые и их симбионты — клубеньковые бактерии — имеют значение не только как поставщики азота для корневого питания. Бобовые (клевер, люцерна) и многолетние травы (злаки) в процессе своего развития в составе травосмеси формируют структурные агрегаты почвы. Чем лучше обеспечены азотом компоненты травосмеси, чем мощнее развивается его корневая система, тем полнее формируется структура.

Как показали исследования последних лет (Рудаков, 1949; Рудаков и Биркель, 1950, 1951), придание прочности структуре почвенных агрегатов за счет формирования активного перегноя также связано с развитием и разложением бобовых растений (клевер).

Чем энергичнее протекает симбиотическая фиксация молекулярного азота системой «клубеньковые бактерии — бобовое растение», тем полноценнее проявляются все перечисленные стороны жизнедеятельности бобовых.

Дополнительное внесение клубеньковых бактерий вместе с семенами бобовых в виде препарата нитрагина, как правило, обеспечивает бобовые растения вирулентными и активными культурами и тем самым повышает ассимиляцию элементарного азота.

Первые опыты по применению нитрагина были начаты в России в 1911 г., но только в 1929 г. нитрагин получил признание и применен для инокуляции сои на площади в 200 000 га.

Начиная с 1935 г., в СССР строятся специальные заводы бактериальных удобрений и применение нитрагина непрерывно возрастает.

Важно отметить, что непрерывно растет и эффективность нитрагина. Первоначально для производства нитрагина применялись случайно выделенные культуры. Затем стали подбираться культуры по признаку достаточной вирулентности и активности и, кроме того, стали учитываться также сортовые особенности бобовых. Было обращено внимание и на подбор культур применительно к «местным» условиям различных частей необъятного Советского Союза. В последнее время ведутся работы по направленному воспитанию клубеньковых бактерий, по переделке их природы для получения максимального эффекта.

Разработка проблемы нитрагина в настоящее время блестяще отражает результативность принципа Лысенко о единстве науки и практики. «...Научное решение практических задач — наиболее верный путь к глубокому познанию закономерностей развития живой природы» (Лысенко, 1948).

## Типы нитрагина

В СССР в настоящее время государственным общесоюзным стандартом, утвержденным 25 марта 1950 г., предусматривается изготовление нитрагина для следующих сельскохозяйственных растений: клевера, люцерны, люпина, сераделлы, донника, гороха, вики, чечевицы, фасоли, конских бобов, коровьего гороха, маша, арахиса, чины.

В США (Moodie, 1948) нитрагин и аналогичные ему препараты готовятся, кроме того, для клевера ползучего (Trifolium repens), гибридного (Tr. hybridum), подземного (Tr. subterraneum), инкарнатного (Tr. incarnatum), лядвенца (Lotus corniculatus), лотуса (Lotus uliginosus), желтой акации (Caragana arborescens), белой акации, дрока (Cytisus scoparinus) астрагала (Astragalus cicer, Astr. falcatus), чечевицы (Lens esculenta) и других бобовых. В последнее время для инокулирования гуара (Guar-Cyamopsis tetragonella) в США выделены культуры из клубеньков Cratalaria sagittalis и Erythrina indica (Erdman, 1948в).

## Технология приготовления нитрагина

Широкое применение нитрагина началось в СССР с 1928 г. После первоначальных колебаний в выборе способа изготовления этого препарата (агаровые и жидкие культуры, нитрагин на торфе) уже с 1931 г. установился единый тип нитрагина — чистые культуры клубеньковых бактерий на стерильной почве.

Изготовление нитрагина осуществляется в СССР заводами и лабораториями бактериальных удобрений по инструкции, утвержденной Министерством сельского хозяйства СССР. Способ изготовления нитрагина описан Лопатиной и др. (Применение нитрагина в земледелии, 1949).

Со времени начала массового производства технология изготовления нитрагина претерпела ряд изменений и значительно улучшена. Однако к настоящему времени опубликованы лишь материалы по улучшению питательных сред, применяемых для массового размножения клубеньковых бактерий при изготовлении нитрагина.

Красильников (1945) предложил выращивание клубеньковых бактерий на отваре сена клевера, люцерны или гороха. Федоров и Богданова (1945) предлагают 2,5—1%-ные отвары сена (тимофеевка, клевер, вика, люцерна). Бернард (1948) рекомендует 5%-ные экстракты викоовсяной смеси, лугового сена, свежей капусты, корней моркови. Он советует также добавлять такие экстракты к синтетическим средам.

В США основное распространение имеет нитрагин, изготовляемый на нестерильном порошке (dust) торфа.

Этот препарат аналогичен предложенному Израильским, Бернардом и Руновым в 1934 г. торфиту. (Торфит, как показали сравнительные исследования, уступает почвенному нитрагину.).

Изготовление распространенного ранее в США агарового нитрагина постепенно сокращается (Leonard, 1944). Выпуск нитрагина в США осуществляют, помимо департамента земледелия, многочисленные частные концерны, выпускающие «инокулянты для бобовых» (Nodule Inoculants) под различными наименованиями Cal-Rhis Legume Bacteria, Farmogerm, Humogerm, GLF Legume Inoculant, Legume Aid, Lecumogen, Nitragin, Nod-o-gen, Pretested Inoculant, Uni-Culture, Urbana culture и т. д.).

В 1943 г. изготовлением нитрагина было занято 11 концернов, объединяющих до 40 производящих фирм (Leonard, 1944).

После Отечественной войны начинают поступать различные предложения об изменении способа изготовления и применения нитрагина.

Еще в 1938—1939 гг. Рюмин впервые предложил для инокуляции клевера и люпина сухие растертые корни этих растений. Красильников в 1945 г. предлагает видоизмененную методику изготовления «корневого нитрагина». После уборки урожая на участках, где был получен хороший урожай бобовых, выкапывают оставшиеся в почве корни. Для инокуляции 1 га однолетних бобовых (горох, фасоль, соя) нужно всего 250 г. сырых корней; для многолетних — 500—600 г сырых корней.

Корни высушивают при 30°, измельчают соломорезкой и хранят в высушенном виде до весны.

За 15—20 дней до посева измельченные корни насыпают в кадку, добавляют 1,5 л воды на каждый килограмм корней, прикрывают сверху и компостируют 10—15 суток в теплом месте (20—25°). Полученная таким путем кашица содержит 10—30 млрд клубеньковых бактерий на 1 г.

Для инокуляции семян на 1 га бобовых нужно около 200 г корневого нитрагина (разведенного водой).

Для характеристики эффективности корневого нитрагина Красильников сообщает следующие данные. Прибавка урожая фасоли 2,1 ц/га (49%), люцерны 2,7 ц/га (16%).

В 1945 г. Гельцер предложила инокулировать бобовые растения клубеньками, собранными с корней соответствующих бобовых, давших высокий урожай. В 1948 г. Гельцер выступила с предложением закладывать специальные «бактериальные питомники» для получения клубеньков, содержащих активно действующие клубеньковые бактерии.

Питомник располагают на богатой, хорошо обработанной (дерновой) почве с нейтральной реакцией; вносится фосфорно-калийное удобрение, зола (как источник микроэлементов) и органическое вещество с малым содержанием азота.

Гельцер и Монжалей (1948) показывают эффективность инокуляции люпина раздавленными клубеньками на Новозыбковской опытной станции, где обычно нитрагин эффекта, как правило, не дает. Аналогичные данные по клеверу и люцерне опубликованы Гельцер (1948в).

Проверку действия клубеньков как инокулятора при получении их с «бактериального питомника» провел Харьков (1949). Им получен следующий урожай клеверного сена (за два года) при различных способах инокуляции: контроль — 54,1 ц/га; нитрагин — 58,3 ц/га, клубеньки — 62,2 ц/га.

Однако статья Харькова вызывает некоторое недоумение. Он пишет: «Клубеньки растолкли в фарфоровой ступке, после чего растворили (?) их в небольшом количестве чистой воды и опрыскали семена». Непонятно, как отделил он клубеньки от корней клевера и каким количеством клубеньков инокулировались семена. Еще более странное впечатление производит его опыт с люпином. Вместо клубеньков с местного «бактериального питомника» он применил (в каком количестве — неизвестно) клубеньки люпина, полученные из ВИУАА [1]. В этом случае особой разницы, по сравнению с нитрагином, получено не было: контроль — 16,6 ц/га; нитрагин — 20,2 ц/га, клубеньки — 21,4 ц/га.

Мишустин (1949), подвергая разбору материалы Гельцер, не видит возражений против предложенных Гельцер «бактериальных питомников». По его мнению, нитрагин, однако, имеет ряд преимуществ перед растертыми клубеньками.

Потаповым (1946) была предложена новая модификация нитрагина — почвенно-агаровый нитрагин. Для его изготовления в полуторалитровую бытылку насыпается 30 г почвы и вливается 50 мл бобового агара. Бутылки стерилизуются 30 минут при 1 атм., после чего они

[1] Всесоюзный институт удобрений, агротехники и агропочвоведения.

охлаждаются при вращении; агар застывает на стенках бутылки. В каждую бутылку вливается 5—6 кубиков обычной жидкой культуры клубеньковых бактерий. Инкубация длится 8 дней. При контрольном анализе — удовлетворительными считаются банки, содержащие 250 млрд. клубеньковых бактерий. Данных об эффективности почвенного агарового нитрагина автор не сообщает.

Красильниковым (1945) предложен «комбинированный нитрагин», состоящий из смеси клубеньковых бактерий, азотобактера и «бактерий-активаторов». Препарат изготовляется на почве или на почвенно-торфяной массе так же, как стандартный нитрагин.

Поскольку значение клубеньковых бактерий и азотобактера общеизвестно, мы остановим внимание лишь на бактериях-активаторах, рекомендуемых Красильниковым. Термином «бактерии-активаторы» Красильников и Кореняко обозначают ряд почвенных бактерий: Pseudomonas fluorescens, Ps. aurantiaca, Azotobacter, Bact. herbicola и др., которые, выделяя так называемые «ростовые вещества» (Красильников, 1944), повышают вирулентность и активность клубеньковых бактерий.

В 1946 г. Красильников и Кореняко расширяют постановку вопроса о сущности действия бактерий-активаторов. На основании лабораторных опытов они делают вывод, что бактерии-активаторы способствуют фиксации клевером элементарного азота и стимулируют рост клевера.

В опыте в качестве активаторов были применены Ps. aurantiaca, Ps. fluorescens, Azotobacter vinelandii, Bact. herbicola. Опыт поставлен в колбочках Эрленмейера емкостью 150 мл. В каждую колбу высевалось 20—25 семян. Сухой вес одного растения вследствие очень большой густоты посева был ничтожен. Количество азота, усвоенного одним растением, не превышало 0,23 мг. Такую малую прибыль азота в клевере (по сравнению с контролем), по нашему мнению, можно объяснить гораздо проще, чем это делает Красильников.

При прорастании семян клевера на поверхности агара остаются семенные оболочки. В контроле они сохраняются без изменений. В опытных же колбочках, в которые были добавлены культуры из рода Pseudomonas или Bact. herbicola, имело место разложение оболочек, освобождение азота в минеральной форме и поглощение его развивающимися проростками клевера. При применении же Az. vinelandii могло иметь место усвоение азота этим организмом без всякой связи с клевером и поглощение биологически связанного азота бобовой культурой. К сожалению, на этом сообщении публикации Красильникова о природе действия бактерий-активаторов прекратились. В практике этот способ применения еще не нашел (Красильников, 1945).

Испытания бактерий-активаторов в полевом опыте в последнее время произвела Мачавариани (1948), которая определила сравнительный эффект, даваемый клубеньковыми бактериями, бактериями-активаторами (Ps. fluorescens № 14 и Azotobacter № 81) и клубеньковыми бактериями, внесенными совместно с бактериями-активаторами. Полученные ею результаты представлены в табл. 1.

Автор на основании этих данных делает вывод о положительном влиянии бактерий-активаторов. Эффект, даваемый этими бактериями, однако, незначителен, не превышает, как правило, 10%. Нужно также учесть, что Azotobacter мог оказать известное положительное действие на урожай не только как активатор, но как азотоусвоитель. Об этом косвенно говорит содержание азота в урожае, который повышается при применении бактерий-активаторов.

Наконец, в последнее время Израильским установлено, что клубеньковые бактерии при высушивании сохраняются 8—9 месяцев, не теряя вирулентности и активности. Предлагается изготовлять «сухой нитрагин», смешивая высушенные клубеньковые бактерии со стерильным тальком.

Таблица 1

**Влияние клубеньковых бактерий и бактерий-активаторов на урожай бобовых**

| Схема опыта | Урожай в ц/га | | | % содержания азота в зеленой массе | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | фасоль | клевер | тайван | фасоль | клевер | тайван |
| Контроль . . . . . | 9,96 | 36,44 | 22,06 | 1,84 | 2,15 | 2,57 |
| Клубеньковые бактерии . . | 11,36 | 41,90 | 28,54 | 1,25 | 2,67 | 3,53 |
| Бактерии-активаторы . . . | 11,19 | 39,79 | 27,01 | 1,78 | 2,52 | 3,12 |
| Клубеньковые + бактерии-активаторы . . . . . | 12,58 | 43,28 | 25,42 | 2,05 | 2,50 | 2,99 |

## Контроль качества нитрагина

В СССР качество нитрагина определяется государственным общесоюзным стандартом, утвержденным в 1950 г. Основные положения стандарта таковы: на 1 га применяется 0,5 кг нитрагина. Каждый грамм нитрагина должен содержать не менее 100 млн. клубеньковых бактерий (нитрагин для сои, люпина, сераделлы и арахиса — 50 млн. бактерий). Присутствие посторонних микробов в нитрагине допускается в количестве не свыше 10% от числа клубеньковых бактерий. Присутствие плесневых грибков не допускается вовсе. Срок годности до 9 месяцев.

Вся продукция заводов находится под контролем Центральной контрольно-технологической лаборатории. Эта система гарантирует снабжение колхозов вполне доброкачественным нитрагином.

Красильников (1945) рекомендует, вместо учета количества бактерий в нитрагине высевом на чашки Петри, пользоваться видоизмененным методом Вильсона. Он предлагает делать последовательные разведения нитрагина (до 10—15) и инокулировать этими разведениями стерилизованные семена соответствующих бобовых, высеянных в колбочки (или стаканы), заполненные простерилизованным питательным агаром, песком или почвой. Через 2—4 недели производится просмотр образования клубеньков, и по последнему разведению, давшему клубеньки, определяется количество Rhizobium в нитрагине.

В США положение с контролем качества нитрагина обстоит значительно хуже. Некоторое регулирование сбыта осуществляется департаментом земледелия и опытными станциями отдельных штатов. Отсутствие в США единой системы контроля приводит к тому, что потребителю попадает значительное количество негодного нитрагина.

Препараты некоторых фирм, как показали Hofer (1949) и Leonard (1945) практически вообще не пригодны для применения в качестве инокуляторов. К числу таких относится, например, препарат-фармоген. По данным 1944 г., из 18 исследованных образцов этого препарата оказались годными только 7 (Leonard, 1944), а в 1945 г. из 12 образцов годными оказались только 5 (Leonard, 1945).

Для определения пригодности и эффективности инокуляторов для бобовых в США лучшим считается вегетационный метод, поскольку таким путем можно культивировать все виды бобовых в строго определенных условиях влажности, освещения и температуры. Leonard (1943, 1945) подробно описывает удобные, по его мнению, приемы. Опыты ведутся в 900-граммовых (32 унции) бутылках с отрезанным дном, имеющих горлышко с винтовой нарезкой. Горлышко бутылки закрывается пробкой из пластмассы с отверстием в центре, настолько малым, чтобы не позволить высыпаться песку. Бутылка заполняется смесью песка, до-

ломита, суперфосфата и сернокислого калия и устанавливается на широкогорлой полулитровой (1 пинта) банке так, чтобы горлышко бутылки почти касалось дна банки. Банка наполняется подкисленным, очень слабым раствором солей цинка, меди, марганца, железа и бора. Когда песок полностью увлажнится поднимающимся по капиллярам раствором, бутылки накрываются крышкой чашки Петри и весь агрегат стерилизуется паром в автоклаве.

Кислотность раствора (pH = 2,0) обеспечивает предохранение песка от случайного попадания Rhizobium через сосуд с питательным раствором.

При насыщении песка кислый раствор нейтрализуется и может служить для нормального питания растений. Дезинфекцию семян проводят в полулитровых бутылях (16 унций).

Семена, предназначенные к высеву, прежде всего, промываются стерилизованной торфяной водой, затем помещаются на 5 минут в 0,2%-ный раствор сулемы. После того как дезинфицирующий раствор стечет, семена снова промывают стерильной торфяной водой, чтобы удалить последние следы сулемы. Семена прикрывают небольшим куском стерильной адсорбирующей ваты, перевертывают бутыль и дают им обсохнуть. Семена проращивают в чашках Петри на 0,6%-ном стерильном агаре.

Проросшие семена помещают в стерильные чашки Петри и здесь обрабатывают заранее приготовленными образцами нитрагина. Обработанные семена помещаются в сосуды для выращивания, в подготовленные лунки, расположенные по кругу, и прикрываются на $^1/_2$ дюйма стерильным гравием.

В вегетационном домике принимаются соответствующие меры для борьбы с насекомыми и создаются специальные условия для каждого вида и сорта бобовых в смысле влажности, лучшего освещения, аэрации и других жизненных условий для роста растения.

## Эффективность нитрагина по областям СССР

Эффективность нитрагина в СССР достаточно высока, что хорошо иллюстрируется сводкой данных, проведенных Министерством сельского хозяйства СССР в 1949 г. в различных областях СССР.

Таблица 2

**Прибавки урожая при применении нитрагина**

| Сельскохозяйственная культура | % прибавки урожая | Число учтенных точек |
|---|---|---|
| Клевер | 17,90 | 10 |
| Люцерна | 14,55 | 6 |
| Люпин | 61,70 | 3 |
| Люпин (семена) | 27,00 | 9 |
| Горох | 20,12 | 134 |
| Вика | 13,30 | 6 |
| Эспарцет | 27,95 | 10 |
| Соя | 16,40 | 12 |
| Фасоль | 30,3 | 4 |
| Чечевица | 7,1 | 2 |
| | Всего | 196 |

Учет эффективности нитрагина производился за последние годы весьма многими сельскохозяйственными опытными учреждениями. Не приводя всего опубликованного материала, остановимся лишь на результатах, полученных от нитрагина по некоторым бобовым культурам — компонентам травосмесей и сидератам. Отметим, однако, прежде всего, то обстоятельство, что, хотя нитрагин нашел широкое применение при посеве травосмесей, мы показываем эффективность лишь по чистым посевам бобовых, так как учет действия нитрагина только на бобовый компонент в травосмеси невозможен. Если же сообщать данные по действию на травосмесь в целом, то эти данные будут преуменьшенными, так как бобовые составляют примерно лишь 50% в урожае травосмеси.

Таблица 3

**Нитрагин и урожай клевера**

| Место проведения опыта | Год | Схема опыта | Урожай | Литературная ссылка |
|---|---|---|---|---|
| Карело-Финская с.-х. опытная станция (Импалакты, Карело-Финской ССР) | 1949 | Контроль<br>Нитрагин | 54,1*<br>58,3* | Харьков, 1949 |
| Институт с.-х. микробиологии (Ленинградская обл.) | 1948 | Контроль<br>Нитрагин | 58,6<br>61,2 | Применение нитрагина в земледелии 1949 (Сборник) |
| Институт с.-х. микробиологии (Ленинградская обл.) | 1948 | Контроль<br>Нитрагин | 37,8<br>42,0 | Применение нитрагина в земледелии 1949 (Сборник) |
| Владимирский завод бактериальных удобрений (Владимирская обл.) | 1948 | Контроль<br>Нитрагин | 23,8<br>31,1 | Применение нитрагина в земледелии, 1949 (Сборник) |
| Московская гос. селекционная станция (Московская обл.) | 1948 | Контроль<br>Нитрагин | 55,0<br>55,0 | Применение нитрагина в земледелии, 1949 (Сборник) |

* Урожай за 2 года.

Уже из этих данных видно, что нитрагин хотя и дает эффект, но эффект не достаточно высокий. Все попытки дать производству более активные и вирулентные культуры до сих пор не достигли своей цели.

В настоящее время в связи с массовым введением травопольных севооборотов вопрос о высокоэффективном нитрагине для клевера приобретает исключительно большое значение. Пора повсеместно, за счет травопольного поля, получать ежегодно 150—160 кг добавочного азота на гектаре за счет ассимиляционной деятельности клубеньковых бактерий (Прянишников, 1945).

Попробуем проанализировать причины малой эффективности нитрагина для клевера и пути ее повышения.

Безусловно прав Бернард, еще раз напоминая в 1948 г., что для проникновения в корневые системы бобовых клубеньковые бактерии должны обладать большой вирулентностью, а для повышения азотоусвоения бобового растения — большей активностью, нежели бактерии, находящиеся в данной почве.

Есть все основания утверждать, что и вирулентность и активность клубеньковых бактерий клевера зависят от кислотности почвы. Уже сам клевер не может развиваться на кислых почвах. В Московской области 10—15% пахотной площади представлено сильно кислыми почвами. На таких площадях клевер почти совсем не развивается. Даже на несколько менее кислых почвах клевер развивается плохо (Кедров-Зихман, 1950).

Ламповщиков (1948) показал, что максимального количества число клубеньков на корнях клевера достигает при pH почвы, равном 6,0 и выше (насыщенность основаниями 90%). При низшем значении pH количество клубеньков, и, нужно полагать, определяющая это количество вирулентность клубеньковых бактерий, неуклонно падают.

Финкельштейн (1949) показал, что количество клубеньковых бактерий на всех полях неизвесткованного севооборота в сотни и тысячи раз ниже, чем на полях совершенно аналогичного, но известкованного севооборота.

Значение известкования почвы для активности клубеньковых бактерий вслед за Яшновой (1938) показала Бородулина (1950).

Таблица 4

**Известкование и активность клубеньковых бактерий клевера**

| Год выделения культуры | Активность (урожай клевера на сосуд в г) | |
|---|---|---|
| | с известкованного поля | с неизвесткованного поля |
| 1947 | 1,93 | 1,02 |
| 1948 | 2,04 | 1,02 |
| 1949 | 2,24 | 1,52 |
| 1950 | 2,38 | 1,06 |

На основании этих данных можно сделать вывод, что клубеньковые бактерии для клеверного нитрагина должны выделяться и отбираться только из клубеньков клевера, выросшего на известкованных почвах.

Действительно, как показывает Бородулина (1950), такие культуры при проверке в песке оказываются и наиболее вирулентными и наиболее активными. Однако стоит применить нитрагин, приготовленный

Таблица 5

**Известкование и урожай травосмесей**

| Место проведения опыта | Урожай травосмесей в ц/га | | |
|---|---|---|---|
| | без извести | с известью | прибавка |
| Совхоз Хлебниково . . . . . | 14,9 | 32,7 | 17,8 |
| „ Воскресенское . . . . | 17,4 | 36,2 | 18,8 |
| Волоколамское опытное поле | 45,0 | 61,0 | 16,0 |
| Центр. опытн. станция ВИУАА* | 8,6 | 50,0 | 41,8 |

* ВИУАА — Всесоюзный институт удобрений, агротехники и агропочвоведения.

на этих культурах, на неизвесткованных почвах, эффект будет гораздо менее значительным.

Эффект же, получаемый от одного известкования (без применения нитрагина) дает, как показывает Кедров-Зихман (1950) для Московской области во много раз лучшие результаты (табл. 5).

Из сказанного можно сделать следующие выводы.

1. При посевах клевера необходимо не только применение нитрагина, но на кислых почвах (дерново-подзолистой зоны), также и известкование.

2. Проверку активности и вирулентности клубеньковых бактерий, предназначаемых для изготовления клеверного нитрагина, необходимо осуществлять не на песке, а на плодородных известкованных почвах. Бактерии, оказавшиеся эффективными в этих условиях, могут служить для изготовления нитрагина. Еще в 1944 г. Соколов писал: «Всякая попытка рассмотрения вопросов клеверосеяния в подзолистой зоне, а, следовательно, и всего вопроса о введении в этой зоне правильных севооборотов, в отрыве от решения вопроса об известковании и фосфо-

Таблица 6

**Нитрагин и урожай люцерны**

| Место проведения опыта | Год | Схема опыта | Урожай | Примечание | Литературная ссылка |
|---|---|---|---|---|---|
| Акковакская агрономическая опытная станция (Узбекская ССР) | 1950 | Контроль<br>РК*<br>РК + нитрагин | 0,38 г<br>0,64 „<br>0,75 „ | Вегетационный опыт | Лазарев, 1950 |
| Таджикская опытная станция (Таджикская ССР) | 1950 | Контроль<br>Нитрагин<br>РК<br>РК + нитрагин | 138,4 ц/га<br>144,4 „<br>165,3 „<br>171,0 „ | Полевой опыт | Лазарев, 1950 |
| Московская селекционная станция „Узуново“ (Московская обл.) | 1945 | Контроль<br>Нитрагин | 225,2 ц/га<br>276,6 „ | Полевой опыт | Гельцер, 1948а |
| Александровская госселекционная станция (Московская обл). | 1947<br>1948 | Контроль<br>Нитрагин<br>Контроль<br>Нитрагин | 54,8 ц/га<br>115,8 „<br>54,2 „<br>102,0 „ | Полевой опыт | Применение нитрагина в земледелии, 1949 (Сборник) |
| Московская селекционная станция (Московская обл.) | 1945 | Контроль<br>Нитрагин | 225,2 ц/га<br>276,6 „ | Полевой опыт | Применение нитрагина в земледелии, 1949 (Сборник) |
| Московская селекционная станция (Московская обл.) | 1948 | Контроль<br>Нитрагин | 27,0 ц/га**<br>40,0 „ ** | Полевой опыт | Применение нитрагина в земледелии, 1949 (Сборник) |

* Фосфорно-калийное удобрение.
** Люцерна + райграсс высокий.

ритовании почвы, без учета реакции почвы и других условий роста клевера и работы клубеньковых бактерий — никчемное занятие, дающее ложное, преувеличенное представление о пользе клеверосеяния в подзолистой зоне и накопления от него биологического азота».

Заслуживают внимания опыты с люцерной (табл. 6).

Из приведенных в таблице данных видно, что нитрагин давал значительный эффект не только в новых районах культуры люцерны (Московская область), но и в местах стародавней культуры.

Четкие и определенные данные получены также при применении нитрагина под люпин (табл. 7).

Таблица 7

**Нитрагин и урожай люпина**

| Место проведения опыта | Год | Схема опыта | Урожай | Литературная ссылка |
|---|---|---|---|---|
| Карело-Финская с.-х. опытная станция (около Петрозаводска) | 1948 | Контроль | 16,6 ц/га | Харьков, 1949 |
| | | Нитрагин | 20,2 „ | |
| | 1947 | Контроль | 51,0 „ * | |
| | | Нитрагин | 75,0 „ | |
| Украинский научно-исследовательский институт соц. земледелия (Украинская ССР) | | Контроль | 5,11** / 76,44 | Заремба, 1950 |
| | | Нитрагин | 8,66 / 122,13 | |
| | | Контроль | 10,5 / 188,0 | |
| | | Нитрагин | 14,5 / 248,0 | |
| Владимирский завод бактериальных удобрений (Владимирская обл.) | 1949 | Контроль | 1,74 ***ц/га | Кожура, 1949 |
| | | Нитрагин | 5,8 „ | |

* Вес одного растения в г.
** В числителе — зерно; в знаменателе — зеленая масса.
*** Вес зерна.

## Условия действия нитрагина

В последнее время опубликован ряд руководств и брошюр по применению бактериальных удобрительных препаратов [Былинкина, Бычковская, Берг, Крутикова, Лопатина, Макарова (1946); Лопатина, Ламповщиков; Лазарева, Крамаренко (Применение нитрагина в земледелии, 1949); Рубенчик, 1945; Доросинский 1949, 1950; Красильников, Кожура 1949; Федоров, 1948; Езубчик и Канашевич 1950 и др.). Во всех этих книжках перечисляются условия, по большей части основанные на более ранних эмпирических данных и необходимые для получения эффекта от применения нитрагина. К числу этих условий относят обработку почвы, соответствующую температуру и влажность почвы, необходимость устранения кислотности почвы, применение удобрений (фосфорных, калийных, микроудобрений) и т. д.

Однако экспериментальные исследования, проведенные в последнее время, несколько поколебали установившиеся положения, они вносят ясность и в детали вопроса. Так, по вопросу о влажности почвы отметим данные Федорова и Подъяпольской (1950), которые показывают, что наиболее высокий урожай фасоли и гороха может быть получен при влажности (песка), равной 80%. При этой влажности энергия прорастания семян также достигает наивысшего значения. По вопросу о влиянии температуры отметим работу Гуковой (1945). Она изучала роль температуры почвы в фиксации азота клубеньковыми бактериями нитрагина. В опыте с горохом для инокуляции был применен нитрагин 1-го Гос. завода бактериальных удобрений. Максимальный урожай и максимальное азотоусвоение получены при температуре почвы 20°. Повышение температуры почвы до 30° и снижение до 15° снижали и азотфиксацию и урожай гороха.

Доросинский и Ламповщиков (1948) изучили влияние низких температур на нитрагин. Авторами установлено, что однократное замораживание почти не влияет на эффективность нитрагина. В очень незначительной степени снижается эффективность нитрагина при двукратном замораживании и оттаивании.

Экспериментальные данные о влиянии микроэлементов имеются как в работах советских, так и иностранных ученых.

Заремба и Синявская (1950) показывают, что прибавка 10 мг бора в виде буры на гектарную порцию нитрагина весьма благоприятно влияет на урожай и азотоусвоение люцерны.

Jensen (1946) отмечает такое же влияние на некоторых почвах молибдена на инокуляцию и урожай бобовых.

За последнее время появились также работы, имеющие своей целью не только выявление положительного и отрицательного влияния того или иного фактора на эффективность нитрагина, но и стремящиеся вскрыть причины, определяющие это действие.

В этом отношении заслуживает внимания работа Бородулиной (1950). Уже в довоенное время неоднократно отмечалось, что различные сорта определенного вида бобовых по-разному реагируют на инокуляцию нитрагином. Бородулина провела наблюдения над фасолью. Ею было установлено, что сорта фасоли короткого дня хуже инокулируются нитрагином при выращивании на длинном дне. Сорта же длинного дня плохо инокулируются при выращивании на укороченном дне. Эти наблюдения вносят значительную ясность в причины различной восприимчивости сортов бобовых к нитрагину.

Заремба и Синявская (1950) провели изучение эффективности «местных» рас клубеньковых бактерий, выделенных в УССР, по сравнению с стандартным штаммом (№ 420), отпускаемым для приготовления нитрагина.

Полученные результаты представлены в табл. 8.

Как видно из таблицы, «местные» культуры оказались в условиях УССР вирулентнее и активнее, нежели стандартные.

Бернард (1948) развивает иную точку зрения. Он полагает, что нитрагин дает положительный эффект в том случае, если культура, послужившая для его приготовления, является и более вирулентной и более активной, нежели «местные». В доказательство он приводит результаты 12 опытов с викой и 12 опытов с горохом, проведенных с инокуляцией почвой, взятой из различных точек Московской, Рязанской и Калужской областей. В среднем урожай вики при инокулировании почвами возрастал на 43,3% (колебания от 0,0 до 96%), а урожай гороха на 28,6% (колебания от 0,0 до 62%). Прибавка урожая от стандартного нитрагина соответственно равнялась по вике 88,3%, по гороху — 34,0%.

Таблица 8

**Значение местных культур клубеньковых бактерий**

| Схема опыта | Урожай сена в ц/га | Вес корней в ц/га | Количество клубеньков на 100 растений | Урожай сена в ц/га | Вес корней в ц/га | Количество клубеньков на 100 растений |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Контроль . . . . . | 66,0 | 43,0 | Нет | 90,0 | 49,0 | 920 |
| Нитрагин (станд. культура № 420) . . . . . | 69,0 | 30,0 | 4150 | 91,0 | 58,0 | 2530 |
| Нитрагин (местн. культура № 1) . . . . . | 84,0 | 44,0 | 4410 | 136,0 | 80,0 | 8780 |
| Нитрагин (местн. культура № 2) . . . . . | 79,0 | 45,0 | 5070 | 134,0 | 64,0 | 9080 |
| Нитрагин (местн. культура № 3) . . . . . | 80,0 | 52,0 | 5660 | 141,0 | 62,0 | 8750 |

Результаты, несомненно, весьма любопытны. Однако Бернард не учел одного: при инокуляции различными почвами каждый раз вносилось разное (неучтенное) количество клубеньковых бактерий. Поэтому урожай определился не только вирулентностью и активностью, но и количеством внесенных бактерий.

Гораздо правильнее поступила Бородулина (1950) при изучении условий повышения активности местных рас клубеньковых бактерий. Она выделила серию культур клубеньковых бактерий из растений с делянок, известкованных различными дозами извести, начиная с 1923 г., а также с делянок неизвесткованных и сравнила их активность в вегетационном опыте. Установлено, что культуры клубеньковых бактерий из известкованных полей, даже полей известкования малыми дозами извести, значительно (на 30—40% по урожаю) активнее культур с делянок, неизвесткованных. Наиболее эффективны культуры с делянок с малой дозой извести (18 т/га).

Аналогичные результаты получены ею при определении активности культур с фосфоритованных полей. Здесь наметилась прямая зависимость между активностью культуры и дозой фосфорита. Наиболее активны культуры с максимально фосфоритованных полей (540 т/га).

Таблица 9

**Эффективность новых культур клубеньковых бактерий**

| Культура клубеньковых бактерий | Урожай за 2 укоса в % к контролю |
|---|---|
| Контроль . . . . . | 100 |
| Станд. культура № 328 | 111 |
| „ „ № 330 | 125 |
| Культура Ю. С. Бородулиной № 2 . . . . . | 115 |
| То же № 69 . . . . . | 132 |

Нитрагин, приготовленный на активных культурах, был подвергнут испытанию в Центральной контрольно-технологической лаборатории (1950) и сравнен со стандартным нитрагином. Результаты испытания сведены в табл. 9.

Из табл. 9 видно, что максимальный эффект дала культура № 69, выделенная в 1949 г. с известкованной делянки.

Для США популярную брошюру о действии нитрагина опубликовал в 1948 г. Erdman (1948a).

Действие нитрагина в США связывают чаще всего с особенностями клубеньковых бактерий. Значение бобового растения, условия среды, в которых протекает азотфиксирующая деятельность системы «бобовое растение — клубеньковые бактерии», в расчет не принимаются. Примером этому может служить позиция (Moodie, 1948), излагающая

общепринятые точки зрения по этому вопросу в достаточно популярной форме. Автор в сжатой, общей форме говорит о значении бобовых и фиксирует внимание на причинах того, что инокуляция не всегда дает эффект. Он отмечает:

1. Условия для получения максимального эффекта от инокуляции недостаточно хорошо известны.

2. Нельзя определять удачу или неуспех инокуляции только присутствием или отсутствием клубеньков на корнях бобовых. Известны паразитарные или неэффективные клубеньковые бактерии, которые, вызывая образование клубеньков, вместе с тем обуславливают лишь ничтожно малую фиксацию азота.

3. Различные штаммы клубеньковых бактерий обуславливают различную степень фиксации азота.

4. Нет удовлетворительного полевого или лабораторного метода, который позволил бы различать эффективные штаммы («good») от неэффективных («poor»).

5. Установлено, что неэффективные штаммы образуют большое количество мелких клубеньков, разбросанных по всему корню, тогда как эффективные образуют обильное количество собранных в грозди клубеньков, преимущественно вблизи и вокруг главного корня. Это наблюдение имеет, однако, самое общее значение, так как форма и размеры клубеньков зависят от сорта растения.

6. Единственным способом определения эффективности клубеньковых бактерий является вегетационный опыт. В таких опытах должен определяться урожай и количество фиксирующего азота.

7. Штаммы, эффективные для одного вида бобовых, не будут эффективны для другого вида, хотя и инокулируют его культуры. Rhizobium trifolii эффективны, например, для красного клевера и неэффективны для подземного клевера (Trifolium subterrianum).

8. Повторные пассажи штаммов могут привести или к утрате эффективности эффективными штаммами или к повышению эффекивности неэффективных.

Мы привели подробное изложение взглядов Moodie (1948), чтобы показать, насколько отстала нитрагинизация в США против СССР. В США до последнего времени все внимание исследователей сосредоточено только на самих клубеньковых бактериях. Это показывают, например, обзорные статьи по клубеньковым бактериям, опубликованные Wilson a. Burris в 1947 г. и Allen Et. a. Allen O. в 1950 г. В первой из этих статей о практическом применении клубеньковых бактерий вообще не упоминается. Авторы же второго обзора ограничиваются следующей фразой, которую мы даем в точном переводе: «Наконец, значение этих бактерий настолько широко признано, что они распространяются в массовых количествах, играя заметную роль в торговле и сельском хозяйстве» (стр. 274). Но на производство нитрагина для различных пунктов страны с учетом местных условий, подбор «местных» культур, а также подбор клубенковых бактерий по сортовым особенностям бобовых и на значение особенностей почвы до сих пор внимания не обращается.

В СССР же научными учреждениями со всей широтой поставлен вопрос о возможности огромного повышения эффективности нитрагина при учете всех особенностей среды, в которых протекает развитие бобового растения. Достаточно привести цитату из работы Соколова (1947): «Если строить севообороты не на основе устарелых агрономических традиций, а на основе современных научных данных, вносить под травы минеральные удобрения и известковать почву под клевер, то накопление биологического азота в сельском хозяйстве можно удвоить». Но и этого мало. Научные работники в СССР уже вплотную подошли к переделке природы клубеньковых

бактерий, к сознательному повышению их вирулентности и активности, приспособлению их к определенным местным условиям, превращению их в галофильные формы.

Лозунг, данный Мичуриным: «Мы не можем ждать милостей от природы; взять их у нее — наша задача» — уже стал реальным лозунгом в области работы с клубеньковыми бактериями и нитрагином.

Московское отделение
Всесоюзного института сельскохозяйственной микробиологии

*Получено 3.III.1951 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

Бернард В. В. Свойства клубеньковых бактерий и действие нитрагина. Сб. Пути повышения активности клубеньковых бактерий, стр. 66, 1948.

Бернард В. В. Растительные экстракты как среда для размножения клубеньковых бактерий. Сб. Пути повышения активности клубеньковых бактерий, стр. 56, 1948.

Бородулина Ю. С. Изменение активности местных рас клубеньковых бактерий в полях севооборота. Рукопись. Фонд библиотеки Моск. отд. Всес. ин-та с.-х. микробиологии, 1950.

Бородулина Ю. С. Сортовые особенности бобового растения как фактор, определяющий заражение его клубеньковыми бактериями. Рукопись. Фонд библиотеки Моск. отд. Всес. ин-та с.-х. микробиологии, 1950.

Былинкина В. Н., Бычковская А. Л., Берг В. А., Крутикова Л. П., Лопатина Г. В., Макарова М. М. Микробиология на службе сельского хозяйства. Ленинград, 1946.

Гельцер Ф. Ю. К вопросу об интенсификации роста многолетних трав и их действие на почву. Доклады ВАСХНИЛ, 3, 16, 1945.

Гельцер Ф. Ю. Новые пути повышения эффективности клубеньковых бактерий. Сб. Пути повышения активности клубеньковых бактерий, стр. 27, 1948а.

Гельцер Ф. Ю. Новый способ получения активных клубеньковых бактерий. Сб. Пути повышения активности клубеньковых бактерий, стр. 42, 1948б.

Гельцер Ф. Ю. Значение бактеризации в повышении урожайности многолетних трав. Советская агрономия, № 7, стр. 59, 1948в.

Гельцер Ф. Ю. и Монжалей П. Д. Повышение фиксации азота клубеньковыми бактериями. Сб. Пути повышения активности клубеньковых бактерий, стр. 36, 1948.

Гукова М. М. Влияние температуры на фиксацию азота клубеньковыми бактериями. Сб. научн. тр. Ин-та агрономии и почвоведения, 30, стр. 33, 1945.

Доросинский Л. М. Бактериальные удобрения. Сельхозгиз, 1949.

Доросинский Л. М. Бактериальные удобрения. Ереван (на арм. языке), 1950.

Доросинский Л. М. и Ламповщиков П. К. Влияние низких температур на эффективность нитрагина. Сб. Пути повышения активности клубеньковых бактерий, стр. 95, 1948.

Езубчик А. А. и Канашевич З. И. Значение микроорганизмов в сельском хозяйстве. Гос. изд. БССР (на белорусск. языке), 1950.

Заремба В. П. Вплив нитрагину на вражай бобовых культур. Соц. товарищество, 3 (на укр. языке), 1950.

Заремба В. П. и Синявская Л. А. Про пидвищення эффективности ди нитрагину. Микробиологический журнал АН УССР, XII, вып. 1, стр. 17 (на укр. языке), 1950.

Израильский В. П., Рунов Е. В., Бернард В. В. Клубеньковые бактерии и нитрагин. Москва, Сельхозгиз, 1934.

Кедров-Зихман О. К. Известкование дерново-подзолистых почв. Московский рабочий, 1950.

Кожура С. И. Бактериальные удобрения. Владимирский з-д бактериальных удобрений, МСХ СССР, 1949.

Красильников Н. А. Фитогормональное действие почвенных бактерий, ДАН, XLII, № 2, 1944.

Красильников Н. А. Микробиологические основы бактериальных удобрений. АН СССР, Москва — Ленинград, 1945.

Красильников Н. А. и Кореняко А. И. Влияние почвенной микрофлоры на вирулентность и активность клубеньковых бактерий. Микробиология, XIII, 39, 1944.

Красильников Н. А. и Кореняко А. И. Влияние неклубеньковых бактерий на рост и азотофиксацию бобовых растений. Микробиология, XV, 5, 1946.

Лазарев С. Ф. Бактеризация семян. Соц. сельск. хозяйство Узбекистана, № 1, 34, Ташкент, 1950.

Ламповщиков П. К. Естественная инокуляция клевера на различных почвах. Доклады ВАСХНИЛ, № 3, стр. 256, 1948.

Лысенко Т. Д. О положении в биологической науке. Стенографич. отчет сессии ВАСХНИЛ, 1948.
Мачаварианн М. З. Влияние почвенной микрофлоры и клубеньковых бактерий на бобовые в условиях Гардабанского района (на груз. языке). Тр. Ин-та полеводства АН Груз.ССР, III, 131, АН Груз.ССР, Тбилиси, 1948.
Мишустин Е. Н. Пути повышения активности клубеньковых бактерий. Почвоведение, № 7, 429, 1949.
Нитрагин. Государственный общесоюзный стандарт ГОСТ 5277-50. Москва, 1950.
Потапов Н. Г. Почвенно-агаровый нитрагин. Научный отчет Сибирского н.-и. ин-та зернового хозяйства за 1941—1942 гг. Сельхозгиз, Москва, 1946.
Применение нитрагина в земледелии (Сборник), Москва, 1949.
Прянишников Д. Н. Азот в жизни растений в земледелии СССР. АН СССР. 1945.
Рубенчик Л. И. Використання микробив для пидвищення врожаю сільско господарских росин. АН УССР, Київ (на укр. языке), 1945.
Рудаков К. И. Микроорганизмы и образование гумуса. Микробиология, XVIII, 481, 1949.
Рудаков К. И. Образование гумуса в процессе развития растения. Тр. юбилейной сессии, посвященной 100-летию со дня рождения В. В. Докучаева, 236, АН СССР, 1949.
Рудаков К. И. Учение Вильямса и задачи сельскохозяйственной микробиологии. Микробиология, XVIII, 289, 1949.
Рудаков К. И. и Биркель М. Р. Развивающееся растение, микроорганизмы и прочная структура почвы. Микробиология, XVIII, 545, 1949.
Рудаков К. И. и Биркель М. Р. Развивающееся растение и образование гумуса (2 сообщ.). Микробиология, XIX, стр. 543, 1950.
Рудаков К. И. и Биркель М. Р. Образование микроорганизмами прочной структуры почвы. Доклады ВАСХНИЛ, № 1, 1951.
Рюмин Н. И. О нитрагине из корней люпина и клевера. Лен и конопля, № 1, стр. I, 1938.
Рюмин Н. И. Сухой нитрагин из корней клевера и люпина. Химизация соц. земледелия, № 1, стр. 62, 1939.
Соколов А. В. Очередные вопросы использования питательных веществ почвы и удобрений в земледелии СССР. Почвоведение, № 6, стр. 241, 1944.
Соколов А. В. Тридцать лет работы советской агрохимии. Почвоведение, № 10, стр. 617, 1947.
Федоров М. В. Биологическая фиксация азота атмосферы. Сельхозгиз, 1948.
Федоров М. В. и Богданова И. В. Новые питательные среды для массовой культуры клубеньковых бактерий. Тр. научн. конф. ТСХА, стр. 65, вып. 1, 1945.
Федоров М. В. и Подъяпольская В. П. Влияние обеспеченности среды фосфором и калием на образование клубеньков и урожай бобового растения. ДАН СССР, т. LXXIII, № 5, 1021, 1950.
Финкельштейн М. Я. Пути повышения эффективности инокуляции клевера. Диссертация, Ин-т физиологии растений АН СССР, 1949.
Харьков Д. В. О заражении бобовых клубеньковыми бактериями, Советская агрономия, № 11, 88, 1949.
Центр. контр. технологич. лаборатория МСХ СССР. Предварительный отчет по испытаниям местных штаммов клубеньковых бактерий и азотобактера. Рукопись, 1950.
Яшнова Н. В. Изучение эффективности естественных рас клубеньковых бактерий. Микробиология, VII, стр. 1036, 1938.
Allen E. K. and Allen O. L. Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. Bact. Rev., **14**, N 4, 273, 1950.
Erdman L. W. Legume inoculation. What it is; what it does. Farmer's Bull. 2003, U. S. D. A. 1948 a.
Erdman L. W. Strains of Rhizobium effective on guar. Soil Sci. Soc. Am., **12**, 214, 1948 b.
Hofer A. W. Legume inoculants tested in 1948. N. Y. State Agr. Exp. St. Bull., N 735, p. 39, Geneve — N. Y., 1949.
Jensen H. J. Nitrogen fixation in legumineus plants, VI. Proc. Linnean Soc., N 13, N. S. Wales, **70**, 203, 1946.
Leonard L. T. A simple assembly for use in the testing of cultures of rhizobia. J. Bact., **45**, No. 6, 523, 1943.
Leonard L. T. Method of testing legume bacteria cultures and results of tests of compencial inoculants in 1943. U. S. D. A. Circular, N 703, 1944.
Leonard L. T. Results of tests of commercial legume inoculants in 1944. U. S. A. D. A. Circular N 724, 1945.
Moodie C. D. Inoculants for legumes Agria Exp. St. Popular Bull., No. 191, Pulman, Washington, 1948.
Wilson P. W. and Burris R. H. The mechanisms of biological nitrogen fixation. Bacter. Rev., **11**, 41, 1947.

# О ПРИНЦИПАХ СЕЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ[1]

*В. М. Богданов*

Вопрос о селекции микроорганизмов, затронутый В. И. Кудрявцевым, имеет исключительное значение. В области молочной промышленности, в которой от свойств чистых культур молочнокислых бактерий в значительной степени зависит качество продуктов, этот вопрос приобретает особенную важность.

Потеря активности и необходимого вкусового букета закваскаами в производственных условиях в большинстве случаев имеет своей причиной методически неправильно построенную селекцию микроорганизмов и культивирование их в лабораторных условиях. Можно без преувеличения сказать, что в большинстве производственных микробиологических лабораторий при культивировании чистых культур микроорганизмов нарушается закон Мичурина — Лысенко о единстве организма и требуемых им условиях жизни.

При обсуждении затронутого вопроса необходимо подвергнуть анализу не только принципы селекции микроорганизмов, но и условия культивирования их в лабораторных условиях.

К сожалению, в настоящее время мы не располагаем фактическим материалом и вынуждены в данной статье лишь поделиться опытом работы с чистыми культурами молочнокислых бактерий в молочной промышленности.

## Выделение чистых культур

Предприятия молочной промышленности получают чистые культуры молочнокислых бактерий от Центральной лаборатории заквасок Всесоюзного научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ), имеющей шесть областных молочноиспытательных лабораторий, находящихся в различных районах Советского Союза. Расположение их в различных климатических зонах, казалось, само должно было указывать на необходимость применения каждой лабораторией местных рас молочнокислых бактерий, которые в данных климатических условиях будут более активными. К сожалению, до настоящего времени большинство лабораторий не занимаются самостоятельной селекцией чистых культур, а использует штаммы центральной лаборатории ВНИМИ.

В молочной промышленности применяются смешанные культуры молочнокислых бактерий. Чтобы избежать антагонистического действия в закваске отдельных штаммов молочнокислых бактерий, следует перед выделением чистых культур производить предварительное обогащение путем ряда пересевов продукта в стерильное молоко. Сохранение необходимой активности и выраженного вкусового букета служат основанием для выделения чистых культур из данного продукта и составления из них заквасок.

Каждая лаборатория должна иметь в своем музее несколько подобранных таким образом смешанных заквасок, которые в случае необхо-

[1] Печатается в связи с дискуссией, проводимой журналом «Микробиология» по вопросам селекции микроорганизмов.

димости могли бы заменить ослабевшую производственную закваску. Совместное культивирование штаммов дает основание ожидать, что в производственных условиях будет сохраняться состав микрофлоры заквасок и их свойства.

В качестве источников выделения чистых культур лучше всего использовать продукты, в которых уже произошло обогащение естественной молочнокислой микрофлорой (например, сметана или сыр).

Однако однократный отбор производственных штаммов, как об этом справедливо говорит В. И. Кудрявцев, еще не может дать полноценных результатов. Практика лабораторных наблюдений показывает, что ценные свойства нередко довольно быстро утрачиваются культурами. Главной причиной этого является несоответствие между лабораторными и производственными условиями развития микроорганизмов.

## Сохранение чистых культур

Сохранение чистых культур в лабораториях должно производиться в условиях, близких к тем, в которых они будут развиваться в производстве. В этом отношении культивирование молочнокислых бактерий в молоке (без дрожжевого автолизата) или на косом агаре из молочной сыворотки является правильным.

С целью длительного сохранения музейных культур следует содержать их под вакуумом в высушенном (методом сублимации) состоянии. Хорошие результаты дает также замораживание культур.

Совершенно очевидно, что лабораторные условия культивирования чистых культур все же будут значительно отличаться от производственных условий. Поэтому при длительном культивировании в лабораториях неизбежно наступает вырождение культур. В целях сохранения ценных свойств микроорганизмов и усиления их необходимо периодическое повторное выделение чистых культур из производственных заквасок. В практике молочной промышленности производственная закваска обычно культивируется на заводе (при ежедневных пересадках) в течение месяца. Сохранение закваской первоначальных свойств в течение этого срока является показателем активности ее микрофлоры. Выделение из этой закваски чистых культур и составление новой закваски из наиболее ценных штаммов будут способствовать улучшению ее качества. Источником для повторного выделения чистых культур могут также служить высококачественные сыры; в сырах происходят многочисленные генерации молочнокислых бактерий, и в зрелом продукте сохраняется основная микрофлора, ведущая процесс созревания.

К сожалению, рекомендуемый В. И. Кудрявцевым принцип повторного выделения чистых культур не применяется лабораториями, снабжающими чистыми культурами предприятия молочной промышленности. Их работа ограничивается лишь выделением молочнокислых культур из различных молочных продуктов.

Перестройка работы по линии непрерывной селекции чистых культур должна стать первоочередной задачей этих лабораторий.

Накопленные ими фактические данные явятся ценным материалом дальнейшего улучшения качества заквасок.

Всесоюзный научно-исследовательский институт молочной промышленности
Москва

*Получено 19.IV.1951 г.*

# МЕТОДЫ ГИБРИДИЗАЦИИ И НАПРАВЛЕННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В СЕЛЕКЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ КУЛЬТУР [1]

*К. В. Косиков*

Редакция журнала «Микробиология» открыла на страницах журнала (№ 2, 1951) дискуссию по вопросу «Принципы селекции микроорганизмов». Нельзя не согласиться с Редакцией, что дискуссия по данному вопросу является своевременной и актуальной.

Широкое применение микроорганизмов в различных отраслях нашей промышленности и повышенные требования к качеству выпускаемой ею продукции ставят перед микробиологами задачу искать наиболее эффективные способы селекции культур микроорганизмов. В связи с этим назрела необходимость разработать и применять новые, более совершенные, более производительные способы получения высокопродуктивных форм микроорганизмов.

Мичурин в результате своей многолетней плодотворной исследовательской деятельности разработал и научно обосновал методы выведения новых сортов растений. На своем собственном опыте он убеждался в эффективности тех или иных способов, применявшихся в этом деле. Мичуринская теория, мичуринские методы управления развитием организмов, изменения их природы в нужном для человека направлении, должны лежать в основе и наших работ по селекции микроорганизмов, по получению новых, более продуктивных штаммов.

Как известно, для выведения новых качественно улучшенных сортов растений Мичурин считал возможным применение следующих трех способов:

1. Первый способ заключается в массовом посеве и отборе растений, пригодных для поставленной цели. Это наименее эффективный способ селекции, поскольку он основан на «случайном» появлении ценных для человека форм.

2. Во втором способе вводится в дело гибридизация. Второй способ, как отмечает Мичурин, более совершенен, более производителен, чем первый, ибо он дает бóльший процент улучшения новых сортов. Но и при помощи одного этого способа, по мнению Мичурина, нельзя полностью использовать возможности изменения природы организма.

3. Наибольшее значение Мичурин придавал третьему способу, при котором экспериментатор основывает свою работу не только на гибридизации, но и на направленном воспитании организмов. Основное внимание в третьем способе уделяется направленному воспитанию организмов в молодом возрасте, которое включает в себя создание соответствующих условий жизни, повторные скрещивания, вегетативную гибридизацию, отбор и т. д.

Самым существенно важным в этом способе является то, что этим путем «можно достичь получения самых высоких положительных результатов, так как большинство деталей здесь находится во власти человека» (Мичурин [24], стр. 23).

При применении этого способа в большинстве случаев можно уси-

[1] Печатается в связи с дискуссией, проводимой журналом «Микробиология» по вопросам селекции микроорганизмов.

ливать развитие полезных и ослаблять или совершенно погашать развитие вредных признаков.

Такова в самых кратких чертах оценка применявшихся ранее и заново созданных способов выведения новых, улучшенных сортов растений, данная Мичуриным на основании научного обобщения многолетнего собственного его опыта на огромном материале по выведению новых сортов плодовых растений и кустарников.

Как мы уже сказали, мичуринская теория, мичуринские методы могут быть применены и в деле получения новых, более продуктивных форм микроорганизмов. Здесь может и должна идти речь только об учете специфики, которую имеют микроорганизмы и, в частности, дрожжи в сравнении с растениями.

Основным и наиболее важным различием здесь, конечно, является различие между одноклеточным и многоклеточным организмами, различие в темпах их размножения. Однако, если говорить о влиянии внешних факторов, условий жизни на изменение наследственности, то микроорганизмы вряд ли обладают более консервативной наследственностью, чем растения. Скорее можно ожидать обратного явления. В отношении большинства микроорганизмов мы не можем применить способ гибридизации, так как они не обладают половым циклом развития. Однако в отношении большинства производственных культур дрожжей этого сказать нельзя. Их можно скрещивать друг с другом. Следовательно, способ гибридизации, о котором говорил Мичурин в отношении растений, может быть в полной мере применен и в отношении спорообразующих дрожжей. Наша задача, как мне представляется, и заключается в том, чтобы, исходя из основных положений мичуринской науки о природе изменчивости и способах выведения новых, улучшенных форм организмов, наметить конкретные пути и методы селекции дрожжевых культур, способы повышения их продуктивности и развития у них наиболее ценных для производства свойств.

Разберем возможность применения к дрожжевым культурам трех способов выведения новых, качественно улучшенных сортов растений, о которых писал Мичурин. Начнем с первого способа.

Наиболее распространенным способом, применяемым в селекции дрожжевых культур в настоящее время, является способ выделения отдельных клеток при специальных массовых посевах или в условиях производства и отбор наиболее ценных культур, полученных из этих отдельных клеток. Несмотря на недостатки этого способа, на его сравнительно малую эффективность и большую трудоемкость, все же при помощи этого способа иногда удается получить хорошие результаты. Предложенный в свое время Ганзеном метод чистых культур, отбираемых из производства, несомненно, был шагом вперед в технической микробиологии. Он резко поднял количественно и качественно продукцию бродильной промышленности. Тем самым практика полностью подтвердила правильность применения чистых культур в производстве. Но, предлагая выделение чистых культур из производства и хранение их в музейных условиях, Ганзен не учитывал изменчивости дрожжевых культур, которая постоянно происходит и в производстве и в музее. Исходя из неверных, автогенетических позиций, отвергающих влияние измененных условий жизни на наследственную изменчивость, Ганзен ограничивался однократным выделением культуры из производства и рекомендовал хранить ее в музейных условиях, не заботясь при этом не только об улучшении культуры, но и о создании условий, обеспечивающих сохранность ценных свойств данной культуры.

Несостоятельность теоретических положений Ганзена была доказана советскими микробиологами, работающими в области бродильной промышленности. Путем выделения из производства отдельных клеток и отбора лучших культур, образованных этими клетками, в ряде случаев

были получены штаммы, значительно превосходящие исходные музейные культуры. Приведу некоторые примеры. Веселовым, Машковой и Рыскиной [2] были выделены из производства расы пивоваренных дрожжей № 11, 41 и 44, превосходящие по своим производственным показателям исходную расу 776. Макаровой [23] под руководством Плевако была выделена также из производства Томская раса № 7 (хлебопекарные дрожжи), отличающаяся рядом лучших показателей по сравнению с показателями других рас, известных в заводской практике. Таким же путем была выделена Островским и Чеботаревой из жидких дрожжей Ростовского на-Дону хлебозавода раса дрожжей, описанная Ситниковым под № 21. Эти дрожжи дают весьма характерную гигантскую колонию и имеют ряд технологических достоинств — обладают хорошей подъемной силой, устойчивы по отношению к спирту, не подвержены дегенерации и т. д. (Островский [27]).

Разумовский [31], Плевако и Шиль [28] выделили из различных дрожжевых культур штаммы, обладающие некоторыми преимуществами перед исходными формами. Много работ по отбору лучших культур дрожжей из производства и из природных условий проведено в области виноделия. Саенко [32, 33] в своем докладе на конференции по микробиологии Всесоюзного научно-исследовательского института виноделия и виноградарства «Магарач» сообщила интересные данные по истории ведения чистых культур и селекции лучших штаммов винодельческих дрожжей учреждениями Института «Магарач», начиная с 1891 г. Следует отметить, что выделенные Саенко в 1927—1928 гг. из осадков крымских вин эффективные расы Пино 14 и Массандра III в течение 20 лет широко применяются в виноделии. Таиров [36] в своей статье указывает, что работа с чистыми культурами винодельческих дрожжей с 1905 г. проводилась Одесской научно-опытной винодельческой станцией. Подбором лучших чистых культур для производства занимались многие научные сотрудники. При этом нередко удавалось подобрать и выделить штаммы, более удовлетворяющие требованиям производства, чем ранее применявшиеся. В качестве примера можно сослаться на работы Шаплыко [38], Преображенского и Клейменовой [30], Дрбоглава [4], Подопригора [29], Щербакова [40] и др. Работы по селекции чистых культур для плодово-ягодного виноделия с успехом были проведены Кирьяловой [8, 9]. Из соков различных плодов был выделен целый ряд новых штаммов, имеющих преимущества перед ранее применявшимися в производстве. Чаленко [37] из осадка быстро сбраживающихся вин выделил и отобрал ряд культур, внедренных в производство за их ценные свойства. Из них можно отметить: Москва 30, Весьегонск 2, Вишневая 28 и Яблочная 7. Квасниковым и Хроликовой [7] выделены новые расы дрожжей для виноделия Узбекистана из местных природных источников (почва, свежие и сушеные ягоды и фрукты, бродящее сусло). Некоторые из выделенных рас обладают высокими качественными показателями и вполне отвечают требованию виноделия местных районов Узбекистана: наряду с глубоким сбраживанием сахаров сусла и стойкостью к высоким температурам Средней Азии дают полное осветление сусла, плотный осадок и значительную стойкость к автолизу. Одинцовой [26] выявлены, изучены и отобраны расы винных дрожжей, обладающие весьма ценными свойствами. Проводится работа по изучению чистых культур и отбору новых рас и в спиртовой промышленности (Шмелев [39], Лещинская [17]; Ситников и Селищенская [35]; Якубовский [41]; Бочаров [1] и др.).

Микробиологи, работающие в бродильной промышленности, знают, что из производства, а в некоторых случаях и из естественных условий, можно выделить штаммы, лучшие исходных, однако они не могут подтвердить, что далеко не всегда такая удача имеет место. Нередки случаи, когда из нескольких десятков выделенных из производства культур

не удается отобрать ни одной, которая бы превосходила по своим производственным показателям исходную музейную культуру.

В тех же случаях, когда из нескольких десятков проверенных культур единичные оказываются лучшими, обычно улучшение это по сравнению с исходным штаммом является весьма незначительным. Не следует забывать, что дрожжам, как и другим организмам, свойственен консерватизм наследственности. Если природные потребности организма нормально удовлетворяются соответствующими условиями среды, изменение наследственности не происходит. Поэтому, совершенно очевидно, что даже систематически проводимое выделение культур из производства не может полностью удовлетворить наши требования. На производстве трудно, а в большинстве случаев просто невозможно создать условия, обеспечивающие изменчивость дрожжей только в нужном нам направлении. Кроме того, загрязнение посторонними микроорганизмами, пока что неизбежное в условиях некоторых производств, изменяет среду, создает неблагоприятные условия для развития производственных микроорганизмов, что может привести, и, очевидно, приводит к ухудшению их ценных свойств. В результате, наряду с клетками, обладающими исходными или улучшенными свойствами, в бродильных чанах будут и такие, которые изменятся в нежелательном направлении. И дело случая, попадет ли при выделении из производства улучшенная или ухудшенная форма. Поэтому, не отвергая методов отбора микроорганизмов из производства и из природных условий и пользуясь ими в тех производствах, где они дают наибольший эффект, необходимо сделать новый шаг в деле улучшения качества дрожжевых культур и других микроорганизмов по пути активного вмешательства в изменение их наследственности в нужном нам направлении. Нам представляется, что на этом пути разработка второго и особенно третьего мичуринских способов — гибридизации и направленных изменений путем воздействия измененными условиями жизни применительно к дрожжевым и другим микроорганизмам — является неотложной задачей в селекции производственных культур. Исходным материалом для работ в этом направлении должны служить чистые культуры лучших музейных штаммов, выделенные из производства, и производственные культуры.

Гибридный организм представляет собой гетерозиготу, обладающую свойствами исходных форм и имеющую более широкие возможности развития и приспособления, чем каждая из родительских особей. Одновременно мичуринская наука рассматривает гибридный организм, как обладающий расшатанной наследственностью. Такие организмы с расшатанной наследственностью более пластичны вследствие присущей им неустановившейся наследственности. При выращивании в соответствующих условиях их значительно легче направленно изменить, приспособить к этим условиям.

Лысенко [22] в своем выступлении по вопросам животноводства развил и обосновал одно из важнейших положений мичуринской генетики, гласящее, что жизненность и наследственность — это свойства одного и того же живого тела, но все же разные. Жизненность организма обычно создается половым процессом, процессом оплодотворения. Степень жизненности в пределах вида зависит от степени различия объединившихся при оплодотворении половых клеток. Первоисточником различия половых клеток являются условия жизни, условия внешней среды, ассимилированные организмами предков, и в особенности непосредственно порождающих данные половые клетки. Отсюда вытекает, что основная биологическая роль клеточных элементов при оплодотворении заключается в создании противоречивости живого тела, его жизненности. Следовательно, исходя из этих положений Лысенко, при соответствующем подборе пар для скрещивания мы можем получить гибридный организм, более жизненный, чем родительские формы, и в то же время обладаю-

щий наибольшей пластичностью в смысле возможности изменения его наследственности в нужном направлении. Поэтому гибриды дрожжей, как исходный материал для селекции, могут представлять определенные преимущества по сравнению с обычными негибридными культурами дрожжей.

Попытаемся теперь наметить конкретные пути применения гибридов дрожжей в селекции.

В зависимости от поставленной задачи можно использовать для этой цели либо гибриды первого поколения, либо, воспользовавшись разнообразием (расщеплением), обычно наблюдающимся во втором половом поколении гибридов, отобрать при этом нужную форму и посредством культивирования на соответствующей среде усилить и закрепить у этой формы нужные свойства.

### Использование первого поколения гибридов дрожжей

Образовавшаяся в результате слияния двух прорастающих спор гибридная диплоидная клетка, как показали наши исследования, в определенных, оптимальных условиях, при вегетативном размножении, довольно устойчиво сохраняет и передает потомству присущие ей свойства и признаки. Как известно, в производственных условиях культурные формы дрожжей редко образуют споры, поэтому расщепление гибрида и возможная в связи с этим потеря некоторых его ценных свойств не представляют реальной угрозы. В лабораторных же условиях, применяя специально изготовленные для этих целей трубки с тремя изгибами, позволяющие выращивать дрожжи в отсутствие кислорода воздуха, нам удавалось около двух лет культивировать гибридов, не допуская спорообразования. Эти обстоятельства делают возможным использование в течение длительного периода времени гибридов первого поколения, сохраняя присущую им при соответствующем подборе пар для скрещивания жизненность. Чтобы получить гибриды, обладающие большей жизненностью, следует скрещивать между собой споры культур, выращиваемых в различных условиях, на различных питательных субстратах. Этим и будет обеспечено различие половых клеток (спор), образующих гибридную диплоидную клетку при скрещивании. Таким образом, подбирая соответствующие пары для скрещивания, дающие наибольшую жизненность гибридов, и создавая наиболее оптимальные условия для их культивирования и продуктивности, и следует вести селекцию у дрожжей, используя первое поколение гибридов. Это, как нам представляется, наиболее перспективное применение гибридизации в селекции дрожжевых культур.

### Использование второго поколения гибридов дрожжей

В том случае, когда необходимо сочетать те или иные отдельные свойства или признаки, характерные для исходных родительских культур, следует получить второе поколение гибрида, т. е. выделить культуры из отдельных спор, образованных клетками первого гибридного поколения. Среди таких культур вследствие обычно наблюдающегося разнообразия (расщепления) по свойствам и признакам, характерным для родительских культур, можно отобрать фомы с наиболее подходящими свойствами для поставленной цели (Косиков [10 11]). Путем культивирования таких форм в соответствующих условиях и отбора можно усилить проявление у них ценных свойств и ослабить или погасить нежелательные признаки (Косиков [12, 14]).

В качестве примера применения гибридизации в селекции дрожжевых культур можно указать на использование в полузаводских условиях

полученного нами гибрида Sacch. ellipsoideus × Sacch. globosus и в дальнейшем Sacch. carlsbergensis × Sacch. globosus. Как известно, Sacch. globosus не сбраживает сахарозу и мальтозу. Sacch. carlsbergensis и Sacch. ellipsoideus хорошо сбраживают эти сахара. Гибридные культуры первого поколения между упомянутыми видами дрожжей сбраживали все те сахара, которые сбраживались в первом случае Sacch. ellipsoideus и во втором случае Sacch. carlsbergensis, т. е. в обоих случаях проявлялось доминирование по ферментативным способностям. Во втором поколении было получено большое разнообразие (расщепление) по способности сбраживать сахара. Среди этого разнообразия были отобраны и такие культуры, которые сбраживали мальтозу, но не сбраживали или слабо сбраживали сахарозу, т. е. свойство сбраживать мальтозу они унаследовали от Sacch. ellipsoideus (или соответственно от Sacch. carlsbergensis), а свойства не сбраживать сахарозу — от Sacch. globosus. При обсуждении возможности использования полученных гибридов в производстве, Веселовым было высказано предположение, что такие культуры можно применить для получения карамельного и бархатного пива. Проведенная под его руководством разработка соответствующего технологического процесса в Институте пивоваренной промышленности дала положительные результаты. Добавленная в сусло сахароза не сбраживалась гибридами, в результате получалось пиво с несброженной сахарозой. Первый гибрид Sacch. ellipsoideus × Sacch. globosus относился к пылевидным дрожжам, поэтому был заменен в процессе работы другим гибридом Sacch. carlsbergensis × Sacch. globosus, обладающим лучшими технологическими качествами.

Среди названных гибридов нами были отобраны такие, которые не сбраживали сахарозу после сбраживания мальтозы сусла. Такие культуры и были переданы в Институт пивоваренной промышленности. В этом институте Литвиновой и Раевской была проведена дополнительная работа по массовому выращиванию гибридов на чистом пивном сусле и отбору наиболее ценных для производства форм. В результате этих работ свойство не сбраживать сахарозу у гибридных культур значительно увеличилось. Был выделен штамм гибрида, названный 131 К, который в течение двух лет культивирования в соответствующих условиях сохраняет свойство не сбраживать сахарозу.

Таковы в общих чертах возможности применения второго способа выведения новых пород — способа гибридизации применительно к селекции дрожжевых культур. Перейдем теперь к рассмотрению третьего способа, предложенного и разработанного Мичуриным,— способа направленного изменения организмов. Этот очень важный и наиболее перспективный способ заслуживает гораздо большего внимания в применении к селекции микроорганизмов, чем это до сих пор имеет место. Возможность получения направленных изменений у микроорганизмов под влиянием измененных условий жизни не подлежит сомнению. Она подтверждена целым рядом исследователей, работающих в различных областях микробиологии. Руководствуясь мичуринской теорией и учитывая известные факты по направленной изменчивости у микроорганизмов, мы попытаемся наметить возможные, с нашей точки зрения, способы направленных изменений применительно к производственным культурам.

Как известно, при подборе исходного материала для направленных изменений Мичурин отдавал предпочтение гибридным организмам. Гибриды, обладая расшатанной наследственностью, легче поддаются влиянию внешних факторов, изменяющих природу организма. Однако, как указывает Лысенко [21], «природу растительного организма можно расшатать:

1) путем прививки, т. е. сращивания тканей растений разных пород;

2) путем воздействия условиями внешней среды в определенные моменты прохождения тех или иных процессов развития организма;

3) путем скрещивания, в особенности форм, резко различающихся по месту своего обитания или происхождения» (стр. 634).

Это открывает широкие возможности использовать различные и негибридные микроорганизмы в качестве исходного материала для направленных изменений. Расшатать наследственность организма можно и при воздействии внешними факторами, условиями жизни. Это доказано многочисленными экспериментальными данными мичуринцев, полученными на различных объектах. Следовательно, работу по направленному изменению микроорганизмов следует вести как с гибридными, так и с негибридными культурами. В каком же направлении и какими способами вести эту работу? Нам представляется, что в настоящее время мы можем говорить о двух направлениях, двух приемах, которыми следует пользоваться в том или ином конкретном случае в зависимости от поставленной цели и качественных особенностей подлежащих изменению микроорганизмов. Дело в том, что каждый организм обладает специфическим, свойственным ему комплексом биохимических реакций, типом обмена веществ. Последовательность этих реакций и степень лабильности в перестройке их систем зависят как от природы организма, так и от тех условий среды, в которых они развиваются.

Чтобы судить об изменчивости и наследственности того или иного микроорганизма, необходимо знать, какими реакциями обмена веществ он обладает и какова лабильность в перестройке системы этих реакций при изменениях условий среды и источников питания. Знание физиологических особенностей и биохимических свойств микроорганизмов даст возможность правильно выбрать воздействующий фактор и подобрать соответствующие условия для направленного изменения природы этих организмов.

## Направленная изменчивость, связанная с ассимиляцией экстрактов и препаратов из родственных штаммов

Разными исследователями на различных микроорганизмах путем культивирования их на фильтратах и препаратах, приготовленных из родственных и близких форм, получены направленные наследственные изменения (Красильников [15, 16]; Грачева [3] и др.). Нет сомнения, что таким путем можно получить направленные изменения и у дрожжей.

Приведу в качестве примера полученные нами (Косиков [13] направленные изменения ферментативных свойств дрожжей при помощи этого приема. При культивировании Sacch. globosus, как уже упоминалось, не сбраживающим сахарозу, на среде, содержащей фильтрат культуры, сбраживающей этот сахар или выделенную биохимическим путем инвертазу, были получены формы, сбраживающие сахарозу. Ассимилируя экстракты и препараты из соответствующих штаммов, дрожжевые культуры сами наследственно изменились, они начали вырабатывать не свойственный им ранее фермент — инвертазу.

Следует подчеркнуть, что новообразование фермента у дрожжей Sacch. globosus происходило в этом случае на среде с сахарозой. Действие фильтрата или препарата фермента инвертазы, включавшихся через цепь биохимических реакций в обмен веществ изменяемых клеток, осуществлялось, очевидно, во взаимодействии с сахарозой и этим способствовало созданию новой для изменившихся клеток ферментной системы, т. е. изменению обмена веществ этих клеток. Поэтому подбор питательной среды и создание соответствующих условий для получения направленных изменений при воздействии фильтратами и препаратами, полученными от родственных штаммов, является необходимой предпосылкой для достижения положительных результатов.

Возникшее в процессе развития новое свойство сбраживать сахарозу стойко удерживается и передается потомству. Надо полагать, что таким

путем можно изменять и другие свойства и признаки как дрожжевых культур, так и других микроорганизмов, учитывая в каждом конкретном случае специфику изменяемого организма и воздействующего фильтрата или препарата. В зависимости от этого следует подбирать соответствующие методы воздействия и способы культивирования.

### Направленная изменчивость, связанная с приспособлением к новым условиям и использованием новых источников питания

Примеров направленных изменений микроорганизмов под влиянием измененных условий развития и источников питания имеется много.

В зависимости от специфики изменяемого организма и поставленной цели применяются разные воздействующие факторы и создаются различные условия развития, приводящие в конечном итоге к изменению природы организма.

Лысенко [21] указывает, что причиной изменения природы живого тела является изменение типа ассимиляции, типа обмена веществ. Такого рода изменения обычно являются результатом развития организма в условиях внешней среды, в той или иной мере не соответствующих природным потребностям данной органической формы. Следовательно, для того чтобы получить направленные изменения, необходимо знать природу изменяемого организма, основные особенности его обмена веществ, присущие ему ферментативные способности. Только в этом случае можно создать соответствующие, не свойственные потребностям данного организма, условия жизни.

Имшенецкий [5] в статье по селекции микроорганизмов дает оценку различным методам селекции, применяемым в микробиологии. В разделе — получение новых рас — приводится много фактов, указывающих на то, что, размножаясь при измененных условиях жизни, микроорганизмы быстро приспосабливаются к этим новым для них условиям. Такое приспособление возможно к самым разнообразным физическим и химическим факторам. Обычный методический прием, применяемый в этом случае,— пересев на средах, содержащих возрастающие концентрации воздействующего химического вещества или физического фактора. Таким путем были получены устойчивые (резистентные) формы различных микроорганизмов к повышенным концентрациям солей, сахаров, к более кислым реакциям среды, к ядовитым веществам и т. д.

В качестве примера такого рода направленных изменений на дрожжах можно привести получение в Институте микробиологии АН СССР форм дрожжей с повышенным температурным максимумом роста (Имшенецкий и Логинова [6], Логинова [18, 19, 20]. Приспособление хересных дрожжей к повышенным концентрациям спирта получено Саенко [33]. В ряде случаев различными авторами получены наследственно измененные формы дрожжей, приспособившиеся сбраживать тот или иной сахар, ранее ими не сбраживаемый. Такие изменения происходят при длительном культивировании изменяемых дрожжей на средах, содержащих соответствующий сахар.

Проведенное нами изучение процесса приспособления при такого рода направленных изменениях показало, что возникающие новые формы иногда обладают неустановившейся, лабильной наследственностью. В других случаях, наоборот, вновь появившееся свойство возникает сразу и стойко удерживается в последующих поколениях. В случае приспособления Sacch. globosus к сбраживанию сахарозы было установлено, что наряду с измененными, приспособившимися клетками в культуре длительное время могут сохраняться и размножаться не приспособившиеся к сбраживанию данного сахара клетки. Более того, приспособившиеся отдельные клетки при спорообразовании дают формы (культуры из отдельных спор), не способные сбраживать тот сахар, к которому

данная клетка приспособилась, т. е. они ведут себя как гибриды. Эти факты необходимо учитывать при выделении из измененной культуры устойчивых, константных по измененному признаку штаммов.

Мы стремились наметить основные направления и способы получения и селекции более продуктивных и высококачественных дрожжевых культур, исходя из учения Мичурина — Лысенко и экспериментальных данных, имеющихся в области изменчивости микроорганизмов. Селекция дрожжевых культур и других микроорганизмов, которая, несомненно, должна быть организована в гораздо большем масштабе, чем это имеет место теперь, даст возможность проверить эти способы, отобрать из них более эффективные и выдвинуть новые. В своих работах по направленной изменчивости и селекции микроорганизмов мы должны исходить из основного положения мичуринской генетики, гласящего, что «...наследование свойств, приобретаемых растениями и животными в процессе их развития, возможно и необходимо» (Лысенко). Мы должны активно вмешиваться в естественный ход эволюции микроорганизмов, применяемых в производстве, изменять их природу в нужном нам направлении. В этом залог нашего успеха.

* * *

Открывая дискуссию по «принципам селекции микроорганизмов» статьей В. И. Кудрявцева «О непрерывной селекции микроорганизмов из производства», Редакция обратилась также с просьбой выступить с критическими замечаниями по поводу статьи В. И. Кудрявцева. Не разбирая детально статью в целом, ограничимся отдельными замечаниями по наиболее существенным, с нашей точки зрения, вопросам, поднятым в ней В. И. Кудрявцевым.

Автор статьи сводит селекцию микроорганизмов к «непрерывному» отбору их из производства. По существу предлагается то, что делалось и делается микробиологами, только не в порядке «непрерывности» и в отношении не всяких производств, а в зависимости от потребностей производства и специфики применяющихся в нем микроорганизмов. Однако обращающим на себя внимание в этой статье является то, что автор объявляет этот метод монопольным, он не допускает даже и мысли о том, что могут существовать другие, более эффективные методы селекции.

Признав все существующие и применяющиеся у нас на производстве культуры дрожжей ослабленными и вырождающимися, В. И. Кудрявцев обосновывает свое столь ответственное обвинение нашим микробиологам-производственникам ссылкой на письмо некоего Якобсена, владельца Карлсбергского пивоваренного завода, датированное 1884 г. Якобсен в своем письме к другому такому же, как и он, владельцу пивоваренного завода пишет, что его лагерное пиво отличается превосходной прочностью и что он получает это пиво на низовых дрожжах, не меняя их в течение нескольких лет, потому якобы, разъясняет В. И. Кудрявцев, что «прежние дрожжи были более сильными, чем современные».

Приведя выдержку из упомянутого письма, В. И. Кудрявцев заявляет: «Ни один современный завод не может похвастать такими результатами...». О каких результатах идет речь, из статьи установить невозможно. Но очевидно, речь идет о качестве пива, ибо дрожжи и разводятся в пивоваренной промышленности только для того, чтобы получать хорошее пиво. Но неужели В. И. Кудрявцев сам серьезно верит и думает убедить других, что лагерное пиво Якобсена в 1882 г. было лучше, чем, скажем, наши современные марки пива?

В свое время И. В. Мичурин писал, как крикливо раздувается реклама, например, в области растениеводства в капиталистических стра-

нах, в целях личной наживы. «Если взять любой американский, да и западноевропейских торговых заведений каталог садовых растений, то вы в течение десятков лет встретите едва-ли десяток новых сортов, пущенных в продажу. Спрашивается, где же находится вся та многотысячная масса якобы выведенных новых сортов как Бербанком, так и всеми другими заграничными деятелями, о которых так много и часто писалось... Здесь, как видно, многое (о чем писалось) существовало лишь в фантазии писателей или в практическом применении оказалось негодным. Такое явление вполне естественно, потому что над всеми деятелями Запада довлеют условия общественной жизни буржуазного строя, в которых почти всякая деятельность сводится к спекулятивному эффекту, причем небольшая классовая верхушка деятелей впитывает в себя чуть ли не целиком весь трудовой заработок рабочих» ([23], стр. 621—622). Вряд ли владелец пивоваренного завода был в этом отношении исключением. Поэтому ссылку В. И. Кудрявцева на письмо Якобсена следует считать совершенно неубедительной и неуместной.

Но оставим на совести В. И. Кудрявцева его доверчивое отношение к письму Якобсена. Посмотрим, какие еще приводятся им доказательства в пользу непрерывной селекции микроорганизмов из производства.

По идее своей непрерывная селекция микроорганизмов из производства, предлагаемая В. И. Кудрявцевым, практически должна привести к ликвидации чистых культур, которые сохраняются и культивируются теперь в музеях чистых культур.

Выступая на конференции по микробиологии, организованной Всесоюзным научно-исследовательским институтом виноделия и виноградарства «Магарач» в 1950 г., Саенко выдвинула идею о превращении музеев чистых культур в селекционные лаборатории. В. И. Кудрявцев, очевидно, согласился с этой идеей и в своей статье пишет об ее целесообразности. Правда, он имеет в виду создание таких лабораторий исключительно с целью «заниматься разработкой метода непрерывной селекции производственных микроорганизмов из производства». Такое ограничение задач селекционных лабораторий совершенно не обосновано. Селекционные лаборатории должны заниматься методами направленной изменчивости, ставя перед собой определенные задачи, по каким свойствам и признакам необходимо улучшать ту или иную культуру микроорганизмов.

В своей статье В. И. Кудрявцев упоминает и о методах гибридизации и направленной изменчивости, однако тут же заявляет, что эти методы являются только «вспомогательными приемами». В лабораторных условиях, пишет В. И. Кудрявцев, можно получить якобы только «предварительно направленное изменение». Он считает, что путем гибридизации и направленной изменчивости нельзя получить нужные формы, «ибо, как бы ни были удачны изменения их (речь идет о микроорганизмах.— *К. К.*) в лабораторных условиях, полученные таким путем культуры никогда сразу не дадут нужного эффекта на производстве». А если «никогда» нельзя в лабораторных условиях получить культуру, которая давала бы «нужный эффект на производстве», то спрашивается, зачем же заниматься этим делом? Ведь если селекционер- микробиолог получит в лабораторных условиях новую, улучшенную расу микроорганизмов и эта раса не даст сразу же эффекта на производстве, т. е. не будет лучше ранее применявшейся, то кто же будет ее внедрять в производство? По существу В. И. Кудрявцев пытается убедить селекционеров-микробиологов, внушить им, что заниматься гибридизацией и направленной изменчивостью микроорганизмов — бесполезное дело, все равно никогда не получишь нужного эффекта. Этим самым отрицается то новое, что дает в руки селекционера мичуринская генетика, мичуринские методы по переделке природы организмов, по направленному их изменению.

Каждый селекционер-микробиолог ставит перед собой задачу не

только улучшать качество наших производственных микроорганизмов, но и выводить новые расы, с новыми, более ценными свойствами. О таких же задачах говорит в своей статье и В. И. Кудрявцев. Но как, какими методами, исходя из каких теоретических предпосылок предлагает он решать эту задачу? Оказывается, никаких методов для выведения новых рас с новыми, более ценными свойствами применять не нужно. Выделяй из производственного чана побольше и почаще отдельные клетки и получишь то, что тебе нужно. Но читатель может спросить: почему получишь именно то, что нужно? В. И. Кудрявцев дает следующий ответ на этот вопрос, исходя из своей теоретической предпосылки. Он считает, что при непрерывном выделении микроорганизмов из производства и отборе из них лучших «каждый завод или группа заводов вновь (после 70 лет, прошедших с введения в практику чистых культур) приобретает возможность непрерывно воздействовать на природу своих микроорганизмов, изменять и улучшать их в соответствии с теми изменениями, которые они сами будут испытывать в связи с исторически меняющимися требованиями человека к продуктам жизнедеятельности микробов». Все здесь получается очень просто и само собой складывается в благоприятную для селекционера-микробиолога сторону: каждый завод непрерывно воздействует на природу своих микробов в сторону их улучшения, а последние «сами» будут испытывать изменения в связи с меняющимися требованиями человека.

В тезисах к докладу «Новый метод селекции микроорганизмов» на конференции по микробиологии в Институте «Магарач» (Ялта, 1950 г.) В. И. Кудрявцев предлагает «начать разрабатывать новый — мичуринский метод непрерывного отбора производственных микроорганизмов, в том числе и дрожжей, из производства». Этим самым он преследует цель добиться главного условия, обеспечивающего успех всего метода,— восстановить «естественный ход эволюции производственных микроорганизмов вместе с эволюцией соответствующих производств». Отсюда напрашивается вывод — не вмешивайтесь в естественный ход эволюции микроорганизмов, пусть они эволюционируют вместе с эволюцией соответствующих производств,— такова теоретическая основа предлагаемого В. И. Кудрявцевым метода.

Как мы уже отмечали, нет оснований называть предлагаемый В. И. Кудрявцевым непрерывный отбор микроорганизмов из производства новым методом, ибо он принципиально ничем не отличается от уже применяющегося метода повторного отбора при селекции как растений, так и микроорганизмов. Почему-то В. И. Кудрявцев называет этот метод мичуринским. Вряд ли можно согласиться с этим. Мичурин пишет в своих трудах о способе отбора у растений, о... «простом отборе сеянцев, выращенных из семян местных лучших сортов, случайно давших хорошего качества плоды и оказавшихся выносливыми к климату данной местности» ([25], стр. 493). Не отрицая применимости этого метода при выведении новых сортов растений, Мичурин считал, что «От посева семян своих местных сортов мы можем получить лишь такого же качества сорта, с очень незначительными случайными улучшениями. В общем, очень медленно, в течение нескольких столетий при воспитании многих генераций сеянцев, и у нас, конечно, можно достичь значительных улучшений, что мы видим по общей истории развития садоводства повсюду. Но при современном быстром течении эволюции во всех деталях жизни человека так долго ждать улучшения нельзя» ([25], стр. 494). Такова точка зрения Мичурина на метод отбора. Как известно, Мичурин отказался от применявшегося и до него метода отбора лучших сеянцев и разработал свои, новые методы гибридизации [2] и направлен-

[2] Как известно, гибридизация применялась различными исследователями и до работ Мичурина. Однако разработанные Мичуриным теоретические основы подбора

ного изменения организмов путем воздействия на них соответствующими условиями жизни. Именно при помощи этих методов Мичурин достиг исключительных результатов.

Девиз Мичурина гласит: «Мы не можем ждать милостей от природы: взять их у нее — наша задача». На основе многолетней плодотворной работы по выведению новых сортов плодово-ягодных растений, Мичурин пришел к следующему важному выводу: «При вмешательстве человека является возможным вынудить каждую форму животного или растения более быстро изменяться и при этом в сторону, желательную человеку. Для человека открывается обширное поле самой полезной для него деятельности».

А В. И. Кудрявцев утверждает в своей статье, что методы гибридизации и направленной изменчивости «никогда сразу не дадут нужного эффекта на производстве», что мы не должны прерывать «естественный ход эволюции производственных микроорганизмов», который должен совершаться «вместе с эволюцией соответствующих производств», что микроорганизмы «сами» будут испытывать изменения «в связи с исторически меняющимися требованиями человека к продуктам жизнедеятельности микробов».

Все это показывает, что нет оснований называть рекомендации В. И. Кудрявцева по непрерывному отбору микроорганизмов из производства мичуринским методом селекции.

Институт генетики
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 28.IV.1951 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бочаров С. Н. Применение сушеных дрожжей в спиртовом производстве. Спиртоводочн. промышл., 5, 19, 1938.
2. Веселов И. Я., Машкова А. С. и Рыскина Э. Е. Подбор рас пивоваренных низовых дрожжей для брожения. Отчет ЦНИЛБП, 1939.
3. Грачева Н. П. Направленная изменчивость кишечной палочки. Агробиология, № 3, 136, 1946.
4. Дрбоглав Н. И. Подбор наилучших рас дрожжей для шампанизации вин. Виноделие и виноградарство СССР, № 6, 4, 1940.
5. Имшенецкий А. А. Селекция микроорганизмов. Вестн. АН СССР, № 6, 47, 1949.
6. Имшенецкий А. А. и Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей к повышенной температуре. Микробиология, XIII, 136, 1944.
7. Квасников Е. И. и Хроликова В. Г. Новые расы дрожжей для виноделия Узбекистана. ДАН Узб.ССР, стр. 27, 1948.
8. Кирьялова Е. Н. и Чистович Т. А. Селекция чистых культур дрожжей для плодово-ягодного виноделия. Докл. Всес. Акад. с.-х. наук им. В. И. Ленина, вып. 18, 30, 1940.
9. Кирьялова Е. Н. Селекция и изучение дрожжей для получения сидра. Микробиология, XV, 385, 1946.
10. Косиков К. В. Гибридизация как фактор изменчивости у микроорганизмов. Природа приспособления дрожжей к сбраживанию сахарозы. ДАН СССР, LXIII, № 5, 1948.
11. Косиков К. В. Гибридизация дрожжей (обзор). Микробиология, XVIII, 549, 1949.
12. Косиков К. В. О наследовании ферментативных свойств у дрожжей. Тр. Ин-та генетики АН СССР, № 18, 157, 1950а.
13. Косиков К. В. Направленное изменение свойств микроорганизмов под влиянием препаратов, полученных от родственных штаммов. Тр. Ин-та генетики АН СССР, № 18, 185, 1950.
14. Косиков К. В. Изменение ферментативных свойств гибридов дрожжей под влиянием условий культивирования. Тр. Ин-та генетики АН СССР, № 18, 195, 1950.

---

пар для скрещивания и направленного воспитания гибридов с целью управления их развитием дают нам основание говорить о мичуринских методах гибридизации в противоположность морганистским, при которых гибридизация сводится к перекомбинации в потомстве гибридов неизмененных «генов».

15. Красильников Н. А. Изменчивость клубеньковых бактерий. ДАН СССР, XXXI, № 1, 90, 1941.
16. Красильников Н. А. Прививка новых свойств вирулентности клубеньковым и некоторым неклубеньковым бактериям. Микробиология, XIV, 231, 1945.
17. Лещинская С. С. Выявление новых производственно-эффективных штаммов дрожжей для спиртового производства. Научно-иссл. сектор по спирту Киевск. техн. ин-та пищ. пром. 1937.
18. Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей. Влияние величины популяции на скорость селекции у дрожжей. Микробиология, XV. 398, 1946.
19. Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей. Кратковременное действие внешних факторов. Микробиология, XIV, 310, 1945.
20. Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей. Брожение, вызываемое дрожжами, адаптированными к высокой температуре. Микробиология, XVII, 15, 1948.
21. Лысенко Т. Д. Агробиология. ОГИЗ — Сельхозгиз, Четвертое изд., 1948.
22. Лысенко Т. Д. Трехлетний план развития общественного колхозного и совхозного продуктивного животноводства и задачи сельскохозяйственной науки. Агробиология, № 3, стр. 26, 1949.
23. Макарова Н. Г. Изучение рас дрожжей, применяемых на всех мелассодрожжевых заводах СССР с целью выделения наиболее эффективных из них. Сб. работ дрожжевого сектора. ЦНИЛБП, 1939.
24. Мичурин И. В. Выведение новых улучшенных сортов плодовых и ягодных растений. Сельхозгиз, 1933.
25. Мичурин И. В., Сочинения, т. I, 1948.
26. Одинцова Е. Н., Ведущий признак отбора культур дрожжей для виноделия и их распространение в природе. Тезисы докладов на конференции по микробиологии. Институт «Магарач», Ялта, 1950.
27. Островский А. И. Жидкие хлебные закваски и жидкие дрожжи (их приготовление и применение). Пищепромиздат, Москва, 1943.
28. Плевако Е. А. и Шиль В. Н. Исследование различных дрожжевых культур и выбор из них наиболее активных. Отчет ВНИИПП, 1949.
29. Подопригор С. В. Изучение расы дрожжей Штейнберг 1892 из разных местностей. Виноделие и виноградарство в СССР, № 9—10. 16, 1940.
30. Преображенский А. А. и Клейменова А. А. Сбраживание клюквенного и яблочного соков на чистых культурах дрожжей. Сб. научно-иссл. работ сектора безалког. промышл. Центр. научно-иссл. лабор. брод. промышл. Наркомпищепрома. Пищепромиздат, стр. 82, 1939.
31. Разумовская З. Г. Испытание рас дрожжей для хлебопечения. Тр. Ленингр. научно-иссл. ин-та пищев. промышл. НКП СССР, 11, 127, 1935.
32. Саенко Н. Ф. Работа Института «Магарач» в области микробиологии за предшествующий период времени. Тезисы докладов на конференции по микробиологии. Институт «Магарач», Ялта, 1950а.
33 Саенко Н. Ф. Повышение спиртоустойчивости хересных дрожжей путем их направленного воспитания. Виноделие и виноградарство СССР, № 2, 22, 1905.
34. Саенко Н. Ф. Направленные изменения природных свойств микроорганизмов и методы селекции хересных дрожжей на спиртоустойчивость. Тезисы докладов на конференции по микробиологии. Институт «Магарач», Ялта, 1950.
35. Ситников А. и Силищенская О. Чистые культуры дрожжей и бактерий для спиртовых заводов. Спиртоводочн. промышл. 5, 16, 1938.
36. Таиров В. Е. Из истории введения в практику русского виноделия дрожжей чистой культуры. Микробиологический журнал, IX, № 1, 138, 1929.
37. Чаленко Д. К. Новые расы дрожжей для плодово-ягодного виноделия. Виноделие и виноградарство СССР, № 4, 8, 1948.
38. Шаплыко И. М. Установление лучших чистых культур дрожжей для плодово-ягодного виноделия БССР, Сб. работ молодых научных работников Научно-иссл. ин-та пищевой промышл. БССР, стр. 71, 1939.
39. Шмелев. К вопросу о происхождении дрожжей расы «Я». Журн. брод промышл. № 4, 1935.
40. Щербаков М. Ф. Крупный успех советского виноделия. Докл. Всес. акад. с.-х. наук им. В. И. Ленина, вып. 1, 29, 1941.
41. Якубовский К. Дрожжи расы Я — III для производства спирта из патоки. Спиртовая промышл. 3, 18. 1938.

# О ПРИНЦИПАХ СЕЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ [1]

*С. С. Лещинская*

Статья В. И. Кудрявцева, помещенная во втором номере журнала «Микробиология» за 1951 г., представляет значительный интерес. Вопросы, затронутые автором, имеют большое теоретическое и практическое значение; их уже давно следовало бы поставить на обсуждение широкой научной общественности.

Выдвинутый автором тезис о новом методе работы в области селекции видов микроорганизмов, на мой взгляд, является совершенно правильным.

Необходимость изменить метод работы вызывается насущными потребностями народного хозяйства и осуществляется многими исследователями на протяжении ряда лет по их инициативе. Однако до сего времени этот вопрос нигде широко не обсуждался. Между тем обмен мнениями на основании экспериментальных данных, полученных исследователями в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства, принесет существенную пользу при разрешении этого сложного вопроса.

Следует приветствовать инициативу редакции журнала «Микробиология» в организации этого мероприятия на страницах журнала.

Вопросом селекции более эффективных штаммов дрожжей для производства спирта Киевский филиал Всесоюзного научно-исследовательского института спиртовой промышленности занимается с 1937 г. Краткая статья с фактическим материалом, полученным нами в результате исследований, была направлена в редакцию журнала «Микробиология» и, насколько мне известно, должна быть опубликована.

В связи с этим я ограничусь лишь некоторыми соображениями по затронутым в статье В. И. Кудрявцева вопросам, касающимся принципов селекции микроорганизмов.

Экспериментальные данные, полученные нами на протяжении ряда лет по сравнительному изучению свойств музейных и производственных культур спиртовых рас ХП и Я, показали, что старый метод однократного отбора чистых культур микроорганизмов, существующий еще со времен Ганзена, в настоящее время является мало приемлемым, так как постепенно приводит к ослаблению полезных свойств у музейных культур микроорганизмов.

Совершенно очевидно, что в интересах улучшения качеств существующих культур микроорганизмов и выведения новых, более эффективных, этот метод должен быть заменен другим, основанным на принципах Мичурина — Лысенко, полностью оправдавших себя в различных отраслях сельского хозяйства.

Этот момент достаточно подчеркнут В. И. Кудрявцевым в его статье.

Новый метод, по мнению автора, должен заключаться в непрерывной селекции производственных культур, в дальнейшем их сравнительном изучении в лаборатории и последующем внедрении лучших из них в производство. В наших исследованиях мы пользовались именно таким

[1] Печатается в связи с дискуссией, проводимой журналом «Микробиология» по вопросам селекции микроорганизмов.

методом, при помощи которого нам удалось выявить наиболее активные штаммы дрожжей и внедрить их в практику работы спиртовых заводов. На основании опыта нашей работы следует отметить, что этот метод требует напряженной совместной работы работников научных учреждений и производства. Ввиду того что на спиртовых заводах за последнее время технические кадры выросли, осуществление нового метода значительно упрощается.

Автор статьи правильно подчеркивает необходимость коренным образом перестроить работу существующих музеев чистых культур. Музеи должны превратиться в научно-исследовательские селекционные лаборатории, постоянно связанные с заводами и доставляющие им каждый раз лучшие культуры производственных штаммов дрожжей.

Нельзя не согласиться с В. И. Кудрявцевым в том, что весьма важным моментом является разработка новых методов хранения культур, обеспечивающих сохранение полезных свойств у микроорганизмов, приобретенных им на производстве, так как продолжительное хранение культур в музее приводит к ослаблению этих свойств. Полученные нами, а также рядом других исследователей экспериментальные данные это подтверждают.

Затронутый вопрос является чрезвычайно сложным, требующим длительного и серьезного исследования с широким обменом опытом.

Несомненно, что в процессе разработки затронутых автором вопросов возникнет ряд других задач, разрешение которых совместными усилиями работников научных учреждений и производств на основе методов Мичурина — Лысенко позволит создать лучшие виды микроорганизмов для различных отраслей промышленности и сельского хозяйства.

В заключение остается выразить пожелание, чтобы в дальнейшем редакция журнала «Микробиология» практиковала подобное широкое научное обсуждение вопросов.

Киевский филиал Всесоюзного
Научно-исследовательского института
спирта

*Получено 19.IV.1951 г.*

# О ПЕРВЫХ РАБОТАХ ПО ПРИСПОСОБЛЕНИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Л. Г. Логинова*

Имеется довольно обширная как русская, так и иностранная литература, посвященная действию различных факторов на микробов с целью изменения их свойств. Однако в ряде исследований применялась главным образом лучистая энергия или сильно действующие химические агенты, которые вызывали случайные изменения у микробов. В дальнейшем производился лишь механический отбор колоний при рассеве на стандартные среды. Только мичуринская биология, основанная на диалектическом понимании наследственности и ее изменчивости, открыла творческий путь для создания новых форм живых организмов, показав роль и значение условий внешней среды в процессе развития организмов.

Для того чтобы получить новые свойства у организма, нужно вначале расшатать его наследственность, а затем... «пластичные неустановившиеся растительные формы, полученные тем или иным путем, следует из поколения в поколение высевать только в тех условиях, потребность или устойчивость, выносливость к которым нужно вырабатывать у данных растений» (Лысенко [2]). Пути направленного изменения природы организмов, так блестяще разработанные Мичуриным и его продолжателем Лысенко, могут быть также широко использованы для получения новых свойств у микроорганизмов. В настоящее время накопился обширный фактический материал, подтверждающий, что методом направленного воспитания микроба можно изменять его природу. Так, в результате длительного культивирования микроорганизмов в определенных условиях среды, в которой они подвергаются действию постепенно увеличивающихся доз того или иного фактора, можно получить новые, наследственно закрепленные свойства у микробов.

В данном случае тот или иной фактор (физический, химический, биологический), к которому мы адаптируем организм, создает вначале неблагоприятные условия в среде для развития и способствует расшатыванию наследственной основы микробов. По мере адаптации организма к определенной концентрации заданного вещества количество его необходимо постепенно увеличивать. При этом, зная биологию данного организма, нужно для его развития подобрать такой состав среды, который был бы специфическим для направленного изменения определенной функции микроба.

Интересно отметить, что еще в прошлом столетии к изучению этого вопроса было привлечено внимание исследователей.

Мимо него не мог пройти наш выдающийся соотечественник Мечников [3], который написал ряд работ о направленном изменении организмов. В 1888 г. им была опубликована сводка работ по адаптации одноклеточных, в которую вошли материалы как его личных исследований, так и его учеников.

Первые систематические работы по адаптации микробов принадлежат нашему русскому ученому Косякову [1] (1887 г.).

Изучая антисептическое действие буры, борной кислоты и сулемы на различные бациллы (палочки сибирской язвы, Bacillus subtilis, Thy-

rothrix scaber и T. tenuis), автор пришел к выводу, что микробы, в процессе длительного культивирования в присутствии антисептика, могут постепенно к нему адаптироваться. Опыты по адаптации микробов Косяков вел на средах, содержащих постепенно возрастающие количества того или иного вещества. Так, обычная палочка сибирской язвы, которая не развивалась на среде, содержащей буру в количестве 0,004%, после постепенного приучения ее к данному антисептику свободно начала развиваться при вышеуказанной дозе. Thyrothrix tenuis обычно прекращает свое развитие при концентрации буры в среде 0,016%, в то время как для адаптированной культуры концентрацией, задерживающей развитие, является 0,021%. Борная кислота оказывает более сильное антисептическое действие, чем бура. Еще более ядовитой для данных микробов является сулема. Ниже приводятся цифровые данные, которые наглядно показывают отношение различных групп к сулеме.

| Наименование культуры | Концентрация сулемы, задерживающая рост микробов | |
|---|---|---|
| | Контроль | Адаптированная культура |
| Палочка сибирской язвы | 1 : 20 000 | 1 : 14 000 |
| Thyrothrix scaber . . . | 1 : 16 000 | 1 : 12 000 |
| Bacillus subtilis . . . . | 1 : 14 000 | 1 : 10 000 |
| Thyrothrix tenuis . . . . | 1 : 10 000 | 1 : 6 000 |

На основании проведенной работы автор приходит к следующим основным выводам.

1. При длительном культивировании микробов на среде, содержащей постепенно повышающиеся дозы антисептика, можно приучить микроба развиваться при дозах, которые при обычных условиях для него были смертельными.

2. Скорость приспособления различных групп микробов к одному и тому же антисептику различна, а также неодинаково и отношение микроба к различным ядам.

Таким образом, Косяков, являясь первым исследователем, работавшим по проблеме адаптации микробов, высказал в своей работе ряд принципиально важных положений, которые и по настоящее время служат руководящими нитями при изучении данного вопроса.

Примерно в эти же годы (1891) другой наш соотечественник Савченко (ученик Мечникова [4]) также обнаружил, что при определенных условиях культивирования можно адаптировать палочки сибирской язвы к крысиной сыворотке, которая при обычных условиях для вышеуказанной бактерии является ядом.

Таким образом, было найдено, что данная культура приобрела невосприимчивость к ядовитому веществу крысиной сыворотки. Danysz (1900) [5] подтвердил этот факт и показал, что бациллы сибирской язвы, адаптированные к этому яду, приобрели способность выделять большое количество слизи, образуя вокруг себя слизистую оболочку. Последняя адсорбирует яд крысиной сыворотки и, таким образом, делает его безвредным.

Одновременно с этим Данич показал, что аналогичным свойством обладает эта же культура, адаптированная к мышьяку. Автору удалось наблюдать, что при ряде последовательных пересевов данного микроба на средах с постепенно возрастающими количествами мышьяковистой кислоты клетки начинают выделять слизь, которая служит микробу «защитным футляром» против яда.

Таким образом, впервые наши русские исследователи дали глубокий анализ происходящему процессу адаптации у микробов в связи с изменениями внешней среды, вскрыв ряд закономерностей, которые управляют этим процессом.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

*Получено 15.III.1950 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Косяков М. Г. (Kossiakoff M. G.) De la propriété que possèdent les microbes de s'accommoder aux milieu antiseptiques. Ann. Inst. Pasteur. I, N 10, 465, 1887.
2. Лысенко Т. Д. Агробиология. Сельхозгиз, стр. 379, 1948. 3-е доп. изд.
3. Мечников И. И. Невосприимчивость в инфекционных болезнях. Медгиз, 1947.
4. Савченко Ю. Б. (Savtschenko J. B.) Zur Frage über die Immunität gegen Milzbrand. Ctbl. Bakt., IX, N 16, 528, 1891.
5. Danysz J. Immunisation de la Bacteridie charbonneuse contre l'action de sérum du rat. Ann. Inst. Pasteur, 14, N 10, 641, 1900.

# РЕФЕРАТЫ

## ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Siegel I. and Kamen M. **Studies of photosynthetic bacteria. VI. Metabolism of isopropanol by a new strain of Rhodopseudomonas gelatinosa. (Изучение обмена фотосинтезирующих бактерий. VI. Разложение изопропилового спирта новым штаммом Rhodopseudomonas gelatinosa).** J. Bact., v. 59, No 5, pp. 693—697, 1950.

Некоторые штаммы Rhodopseudomonas используют изопропиловый спирт как донатор водорода для фотовосстановления $CO_2$, согласно следующему уравнению:

$$2C_3H_7OH + CO_2 \rightarrow 2C_3H_6O + (CH_2O) + H_2O$$

Этот процесс был изучен авторами с помощью изотопной методики. В качестве объекта была взята Rh. gelatinosa — подвижная палочка, разжижающая желатину и окисляющая изопропиловый и другие спирты, кетоны и органические кислоты.

Rh. gelatinosa выращивались на синтетической среде с добавлением витаминов, изопропилового спирта и меченого бикарбоната при непрерывном освещении. После четырех суток роста культуры центрифугировались и из жидкости осаждался ацетон (2-4-динитрофенилгидразином). Из бактериальной массы готовилась взвесь, в которую добавлялся изопропиловый спирт и меченый бикарбонат. После двухсуточной выдержки на свету в анаэробных условиях взвесь также подвергалась описанной выше обработке. Полученные при этом бактериальная масса и обе фракции ацетона анализировались на содержание $C^{14}$. Анализ показал, что при высоком содержании $C^{14}$ в бактериальных телах обе фракции ацетона не содержат $C^{14}$. Отсюда авторы заключают, что превращение изопропилового спирта в ацетон как растущими (в культуре), так и покоящимися (во взвеси) клетками Rh. gelatinosa происходит путем прямого дегидрирования первого без использования его углеродного скелета для синтеза клеточных элементов.

*Ю. Сорокин*

Wessman G. and Werkman C. **Biotin in the assimilation of heavy carbon in oxalacetate. (Роль биотина в ассимиляции тяжелого углерода с образованием щавелевоуксусной кислоты)** (Arch. Bioch., v. 26, No. 2, pp. 214—217, 1950.

Исследовалась обменная реакция между щавелевоуксусной кислотой и $NaHC^{13}O_3$ при воздействии на эту смесь ферментативного препарата из Micr. lysodeikticus, способного к связыванию $CO_2$ с образованием щавелевоуксусной кислоты. Ферментативный препарат готовился путем растворения клеток Micr. lysodeikticus кристаллическим лизоцимом. Авторы поставили своей целью выяснить, принимает ли биотин участие в этой реакции как активная группа фермента. Оказалось, что если инактивировать биотин яичным белком или препаратом авидина, то обменная реакция прекращается и возобновляется вновь, если добавить биотин. Таким образом, авторы заключают, что биотин действует как коэнзим при фиксации $CO_2$.

*И. Работнова*

Rhodes M. **Viability of dried bacterial cultures. (Выживаемость высушенных культур бактерий).** J. Gen. Microb., v. 4 (2), pp. 450—456, 1950.

Описывается метод хранения чистых культур различных бактерий. Этот метод заключается в высушивании чистых культур бактерий над $P_2O_5$ в вакууме. Операция по высушиванию проводится следующим образом: на боковую поверхность короткой стерильной пробирки наносится капля кровяной сыворотки, и в нее вносится петлей небольшое количество соответствующей культуры, выращенной на твердой среде. Такая пробирка, закрытая ватной пробкой, вставляется в более длинную пробирку, на дно которой предварительно насыпается $P_2O_5$. На длинной пробирке делается перетяжка, и она присоединяется к вакуумному насосу. После откачки воздуха пробирки запаиваются. Высушенные культуры хранятся в темноте при комнатной температуре.

Изучение выживаемости высушенных культур (при длительности хранения до 14 лет) показало, что выживает 83% культур. Наибольшей стойкостью к высушива-

нию обладают роды: Staphylococcus, Sarcina, Micrococcus; наименьшей стойкостью — роды: Vibrio, Neisseria. Процент клеток, выживающих при высушивании отдельных культур, колеблется от 18 до 92.

*Ю. Сорокин*

Berger U. **Über antibiotische Mikrokokken aus der Luft (Об антибиотических микрококках из воздуха).** Z. Hyg., Bd. 132, H 1, S. 47—58, 1951.

Дается простой метод выделения из воздуха микрококков, обладающих антибиотическими свойствами. К 8 мл МПА добавляется 0,2 мл разведенной в 100—200 раз суспензии 16-часовой культуры St. aureus на 1%-ном глюкозном бульоне. Смесь выливается в чашку, оставляется без крышки $1^1/_2$ часа на воздухе, затем инкубируется 48 часов при 22° для роста микрококков и 24 часа при 37° для развития St. aureus. Сразу или после дополнительной инкубации на чашках появляются ясные зоны вокруг колоний антагонистов. Из 30 выделенных микрококков автор изучил 6 штаммов.

Это большие, неподвижные, грамположительные диплококки, растущие на жидких и твердых средах при температурах 22—45° с оптимумом в 37°, не обладающие патогенными свойствами. Биохимически микрококки характеризуются редукцией метиленовой сини в молоке, кислотообразованием на среде с глюкозой, стойкостью к желчи и отсутствием разжижения желатины. Расщепление лактозы, сахарозы, образование каталазы, свертывание молока, образование газа и индола не являются постоянными признаками. При испытании антибиотической активности штрихами и уколом в пластинку с тест-объектом был обнаружен широкий спектр действия на грамположительных и грамотрицательных бактериях. Антибиотические свойства микрококков объясняются образованием ими перекиси водорода. Это было подтверждено рядом опытов по инактивации антибиотика каталазой, пероксидазой и другими веществами, разлагающими $H_2O_2$, а также прямой перекисной реакцией по Avery и Morgan. Микрококки сами чувствительны к перекиси водорода в зависимости от степени образования ими каталазы. Изученные микрококки относятся автором к виду «Micrococcus antibioticus».

*А. Космачев*

Iordan I. V. and Anderson I. R. **Effect of boron on nitrogen fixation by Azotobacter (Влияние бора на азотфиксацию Azotobacter)** Soil Sci., v. 69 (4), pp. 311—319, 1950.

Авторы провели две серии опытов. Первая серия касалась выяснения влияния на азотфиксацию удобрения почвы бором (от 0 до 320 фунтов на акр).

Спустя полгода после внесения бора пробы этих почв высевались на чашки с безазотной агаризованной средой. С каждой пробой ставилось по 12 чашек. Через каждые 7 дней в течение 3 недель в 4 чашках каждой пробы определялся азот.

Анализы показали, что при увеличении содержания в почве усвояемого бора от 0,3 γ/г до 1,7 γ/г азотфиксация возрастает на 100—150%. Вторая серия опытов проводилась с целью изучения влияния бора на азотфиксацию в чистых культурах Azotobacter chroococcum. Взвесь клеток этого организма высевалась на безазотистые среды (агаризованную и жидкие), в которые перед посевом вводилась борная кислота в разных количествах (до 320 γ/мл). При этом оказалось, что добавление бора увеличивает скорость азотфиксации (на 60—80%). Оптимальная концентрация бора для семидневных культур равнялась 7 γ/мл на агаре и 3 γ/мл в жидкой среде.

*Ю. Сорокин*

Winter A. u. Rümker R. **Die Mikroflora der Rhizosphäre als resistenzbestimmender Faktor (Микрофлора ризосферы как фактор, определяющий резистентность).** Arch. Mikrob., Bd. 15, H. I, S. 72—83, 1950.

Изучалось влияние микрофлоры ризосферы на поражение корней прорастающей пшеницы и кукурузы паразитическими грибками Ascochyta pinodella и Fusarium culvorum. Опыты проводились в стерильных условиях на синтетической агаровой среде, песке, пропитанном этой же средой, и на естественных почвах. Стерильно прорастающие пшеница и кукуруза, обычно резистентные к Ascochyta pinodella и Fusarium culvorum, легко поражались этими грибами, при этом наблюдались серьезные патологические изменения. Добавление нестерильной почвы предохраняло растения от инфекции благодаря ризосферной микрофлоре. Внесение различных микроорганизмов также предотвращало заражение растений грибками. На основании этого автор считает, что микрофлора ризосферы, предохраняющая растения от инфекции, неспецифична. Fusarium culvorum, в стерильных условиях являющийся для кукурузы паразитом, при заражении ее ростков в нестерильном субстрате обра-

зует защитную микоризную зону и, вытесняя опаснейших возбудителей зародышевых микозов, способствует развитию ростка.

*А. Космачев*

Winter A. **Zur Verbreitung und Bedeutung der Mykorrhiza bei Landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. (К вопросу распространения и значения микоризы у культурных сельскохозяйственных растений).** Naturwiss., H. 23, S. 542—543, 1950.

По наблюдениям автора, у овса, ржи, пшеницы, ячменя, кукурузы и клевера поражение эндотрофной микоризой охватывает до 90% корней. Мицелий проникает через корневые волоски и эпидермис, часто вплоть до окончания корня; образование корневых волосков от этого не страдает. Сильное микоризообразование часто сопровождается плохим ростом растения. На окультуренных почвах, как богатых, так и бедных питательными веществами, разницы в микоризообразовании не наблюдалось. Решающим моментом для образования микоризы автор считает не качество почвы, а наличие в ней гриба. У лука репчатого, лука-порея и чеснока, произраставших на различных почвах, наблюдалась незначительно связанная с ними микориза, у картофеля же микориза была установлена только в одном случае.

*А. Космачев*

Schelhorn M. **Untersuchungen über den Verderb wasserarmer Lebensmittel durch osmophile Mikroorganismen (Исследования о порче осмофильными микроорганизмами продуктов питания бедных водой).** Z. Lebensmittel., Bd. 91, H. 2, S. 117—124; I. Mtg; H. 5, S. 338—342. II Mtg., 1950.

Пищевые продукты, содержащие высокие концентрации сахара и не доступные обычным микробам, могут использоваться осмофильными дрожжами и плесенями. Автором изучались оптимальные жизненные условия для осмофильных дрожжей. Плодовые сиропы различных концентраций, соответствующих 78—66% относительной влажности воздуха, заражались осмофильными дрожжами и культивировались при 10, 20 и 30°. В сиропах с концентрацией 78% относительной влажности воздуха при 10° брожение наступало через 2 месяца, при 20° — через 13 дней, при 30° — через 7 дней; с концентрацией 70% относительной влажности воздуха при 10° сбраживание отсутствовало, при 20° наступало через 2 месяца, при 30° — через 19 дней; с концентрацией 66% относительной влажности воздуха сбраживание наблюдалось только при 30° через 3 месяца. Из приведенных данных следует, что хранение в прохладном месте предохраняет концентраты, содержащие сахар от сбраживания осмофильными дрожжами. При оптимальной температуре и концентрации сахара в субстрате наиболее бурное размножение клеток и сбраживание наблюдались при pH = 4—5.

С фруктозным сиропом и грушевым концентратом изучались границы осмофильности наиболее стойких к высоким концентрациям Zygosaccharomyces Barkeri. Культивирование велось на субстратах с концентрацией от 56 до 65% относительной влажности воздуха, pH = 4,8, при 30°. Через 2 месяца проводился подсчет живых клеток рассевом на чашках. Границей размножения является сахарсодержащий субстрат концентрации 62% относительной влажности воздуха; при концентрации 60% относительной влажности воздуха клетки не размножаются, но месяцами сохраняют жизнеспособность. Осмофильные дрожжи портят плодовые сиропы, экстракты, концентраты, в которые они попадают с плодами. Указанные продукты портятся также плесневыми грибами, главным образом Aspergillus glaucus и родственными ему организмами, менее осмофильными, чем описанные дрожжи, но более стойкими к нагреванию. Автором изучалось развитие Asp. glaucus на яблочном концентрате с молочной, лимонной и янтарной кислотами, при постоянной температуре и pH = 3, 4, 5, 6. Оптимальные границы pH = 4—6. При pH = 3 через 2 недели наблюдалось очень слабое развитие грибка.

На фруктозном сиропе с pH = 3, 5, 7 и концентрациями, соответствующими 78—70% относительной влажности воздуха, при 30° Asp. glaucus культивировался в пробирках и висячей капле, наблюдение велось в течение одного года. В пробах с pH = 7 и концентрацией 78—74% относительной влажности воздуха через 2 месяца, при более высоких концентрациях отсутствовало.

При pH = 5 и 73% относительной влажности воздуха пленка образовывалась через 10 месяцев, при pH = 3 только в концентрации 78—77% относительной влажности воздуха через 2 месяца. В опытах с плодовыми концентратами, выдержанными 3 месяца при 30°, наблюдалось развитие грибка: у грушевого концентрата,

pH = 4, 5, концентрацией 76% сухого вещества, соответствующей 72,6% относительной влажности воздуха; у яблочного концентрата, pH = 3, 5, концентрацией 72,5% сухого вещества или 76% относительной влажности воздуха; у смородинового, pH = 2,6, концентрацией 70% сухого вещества или 79% относительной влажности воздуха. Подкисление концентрированных сахарсодержащих продуктов предохраняет их от порчи, вызываемой осмофильными плесневыми грибами.

*А. Космачев*

Stille B. **Eine mikrobiologische Methode zum Nachweis von Samen- und Wurzelausscheidungen (Микробиологический метод обнаружения выделений семян и корневых выделений).** Arch. Mikrob., Bd. 15, H. I, S. 149—151, 1950.

Автор описывает микробиологический метод определения веществ, выделяемых прорастающими семенами и корнями. Модификации метода позволяют изучать выделения ризоидов, мицелия грибов и т. п. Определение, которое ведется стерильно, заключается в следующем. Голодная среда с 2% выщелоченного бидистиллятом агара разливается в чашки. Пробковым сверлом вырезаются кружочки агара и переносятся скальпелем на предметные стекла, расположенные в чашках, на дне которых находится смоченная водой фильтровальная бумага. Объекты, выделения которых исследуются, накладываются на агаровые кружочки и затем удаляются по одному через разные промежутки времени. Кружочки засеваются подобранным тест-организмом. Сила роста последнего дает приблизительное представление об объеме выделений.

Для качественного и более точного количественного определения, наряду с вышеописанным, приготовляется второй ряд кружочков из агаровой среды, в которой в достаточном количестве имеются все необходимые для взятого тест-организма питательные вещества, кроме подлежащего определению. Последнее вносится в уменьшающемся количестве, вплоть до полного отсутствия. Объекты накладываются только на кружочки из голодного агара. Сравнение интенсивности роста тест-организма на кружочках первого и второго ряда позволяет судить о качестве и количестве выделенного исследуемым объектом вещества. Как иллюстрацию к методу автор приводит определение выделений прорастающего зерна пшеницы, где в качестве тест-организма он применяет Aspergillus niger.

*А. Космачев*

Stirling A. G., Stevens M. K. and Lawley D. N. **Colony counts on strips of Agar in tubes (Подсчет колоний на полосках агара в пробирках).** J. Gen. Microb., v. 4 (2), pp. 339—344, 1950.

Для количественного учета микрофлоры авторы предлагают следующий метод: в пробирки наливают 1,5—2 мл 2%-ного питательного агара, который перед этим выдерживается 1 час при температуре 45° для предотвращения выделения конденсационной воды при его застывании. Затем в каждую пробирку добавляется 0,1 мл соответствующего разведения изучаемой культуры. Смесь перемешивают, вращая пробирку между ладонями. Пробирку кладут так, чтобы верхний конец ее был слегка приподнят и агар не доходил на 2—3 см до ватной пробки. После застывания агара пробирка выдерживается в термостате в вертикальном положении и выросшие колонии просчитываются.

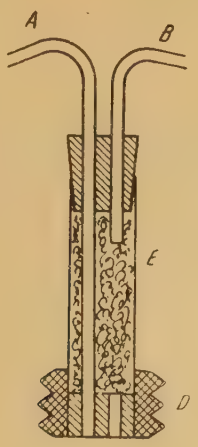
Проверка этого метода путем сравнения его с чашечным показала, что он дает совпадающие результаты.

*Ю. Сорокин*

Heatly N. G. **A versatile fermentation sampling arrangement (Приспособление для стерильного отбора проб и выполнения ряда других операций при изучении брожений).** J. Gen. Microb., v. 4 (2), pp. 410—412, 1950.

Автор описывает простое приспособление для стерильного отбора проб из бродильных сосудов. Резиновая трубка *A*, один конец которой проведен в бродильный сосуд, соединяется другим своим концом с толстой стеклянной трубкой *E*. На конец трубки *E* плотно насаживается колпачок *O* с резьбой для навинчивания стерильных склянок. Трубка *E* набивается ватой и через верхнюю пробку в нее проводится трубка *B*, через которую в системе ртом создается вакуум. При этом жидкость из бродильного сосуда по трубке *A* переливается в склянку, навинченную на колпачок *O*, после чего эта склянка свинчивается и заменяется новой

Такое приспособление может быть применено также для стерильного внесения в бродящую жидкость посевного материала и стерильных растворов, для удаления




в стерильных условиях жидкости над осадком из бродильных сосудов и для выполнения других подобных операций.

*Ю. Сорокин*

Billen D., Lichstein H. C. **Nutritional requirements for hydrogenase production by E. coli. (Влияние питания на образование гидрогеназы у E. coli).** J. Bact., v. 59, pp. 311—314, 1950.

Обнаружено, что клетки E. coli, выращенные на средах с глюкозой, не содержащих органических источников азота, не обладают гидрогеназной активностью. В связи с этим авторы изучали влияние различных источников азотного питания на образование гидрогеназы у E. coli. С этой целью 100 мл среды, содержащей различные источники органического азота, заражались одним мл 24-дневной культурой, неоднократно пересеянной на глюкозной среде с фосфорнокислым аммонием, и выдерживались 21 час при 37°; затем культуры центрифугировались, промывались и из осадка готовилась суспензия, в которой обычным способом определялась активность гидрогеназы. Оказалось, что синтез клетками E. coli гидрогеназы зависит от присутствия в среде определенного набора аминокислот, особенно важными из которых являются глютаминовая кислота, метионин и далее тирозин, серин и цистин

*Ю. Сорокин*

Ephrussi B., Slonimsky P. **Effect de l'oxigène sur la formation des enzymes respiratoire chez la levure de boulangerie. (Влияние кислорода на образование дыхательных ферментов у хлебопекарных дрожжей).** C. R. Acad. Sci., v. 230, pp. 685, 1950.

Исследовалось влияние аэрации на образование дыхательных ферментов хлебопекарными дрожжами Saccharomyces cerevisiae штамм 59R. Дрожжи культивировались при 28° на среде с 1% дрожжевого экстракта и 5% глюкозы. Дрожжи, культивировавшиеся в аэробных условиях, показывают характерный спектр цитохромной системы. У дрожжей, размножавшихся в анаэробных условиях, количество цитохрома C снижается более чем в 50 раз, а спектр характеризуется полным отсутствием всех нормальных линий и появлением двух новых линий $\alpha a_1$ и $\alpha b_1$ у $\approx 580$ и 459 mμ соответственно. При перенесении таких дрожжей в хорошо аэрируемую безазотистую среду с глюкозой начинают образовываться цитохромы, что подтверждается появлением линии цитохромов c, b и a, интенсивность которых со временем возрастает. Таким образом, переход из анаэробного состояния в аэробное может происходить без клеточного размножения. Обратный переход возможен, но требует активного размножения клеток. Авторы считают, что исчезновение цитохромов происходит за счет процесса «разбавления», то-есть распределения имевшихся цитохромов по делящимся клеткам, при полном отсутствии их новообразования. Авторы ставят под сомнение существующее мнение о конститутивном характере дыхательных ферментов. Поскольку у дрожжей, размножающихся в отсутствие кислорода,

цитохромы не обнаруживаются, а их синтез в аэробных условиях может происходить и без клеточного деления, это дыхательная система относится авторами к адаптивным ферментам.

*Ю. Карасевич*

Hersly D. F., Ajl S. I. **Phosphorylation due to the oxidation of succinic acid by cell free extracts of E. coli (Фосфорилирование при окислении янтарной кислоты бесклеточными экстрактами E. coli).** J. Gen. Phys., v. 34, pp. 295—304, 1951.

Изучалась возможность фосфорилирования, сопряженного с окислением янтарной кислоты в фумаровую, ферментным препаратом E. coli. Препарат получался экстрагированием водой порошка сухой бактериальной массы, растертой со стеклянной пылью. Опыты ставились в сосудиках Варбурга. О скорости окисления янтарной кислоты судили по потреблению кислорода. Оказалось, что в отсутствие ортофостата окисление янтарной кислоты препаратом E. coli почти не идет. При добавлении $PO'''_4$ наблюдалось потребление кислорода и исчезновение $PO'''_4$, сопровождавшееся параллельным накоплением лабильносвязанного органического фосфата. Азид натрия и 2-4-динитрофенол тормозили исчезновение ортофосфата, стимулируя окисление янтарной кислоты.

Анализируя эти данные, авторы заключают, что, так же как и в клетках других организмов, в бактериальных клетках существует механизм сопряженного с окислением фосфорилирования, обеспечивающий усвоение клеткой энергии окислительных процессов.

*Ю. Сорокин*

Meiklejohn J. **The effect of glucose on impure cultures of nitrifying bacteria (Действие глюкозы на смешанные культуры нитрифицирующих бактерий).** Plant and Soil., v. III, No. 1, pp. 88—93, 1951.

При оценке процесса нитрификации в почве необходимо учитывать наличие в почве, наряду с нитрификаторами, других видов бактерий. Для чистых культур нитрификаторов глюкоза концентрации 0,2—0,3% является ядовитой. Интересно было выяснить, каково будет действие глюкозы на процесс нитрификации, проходящий в смешанной культуре. Культура Nitrosomonas и Nitrobacter в смеси с Proactinomyces, Micromonospora и другими видами микробов выращивалась при 25° на среде для нитрификации с 0,005 моля $(NH_4)_2SO_4$ в присутствии глюкозы и без глюкозы. Глюкоза в количестве, необходимом для получения в среде 0,02 молярной концентрации, добавлялась или непосредственно в среду перед стерилизацией ее в автоклаве или же фильтровалась через бактериальный фильтр и добавлялась в стерильную среду. Через определенные промежутки времени определялись нитраты и нитриты. Оказалось, что добавления фильтрованной глюкозы сильно замедляет процесс нитрификации, но не оказывает вредного действия на культуру нитрификаторов.

Внесение в среду с последующей стерилизацией в автоклаве оказывает более резкое действие на нитрификаторов: процесс нитрификации останавливается, а культура нитрификаторов сильно ослабляется. По всей вероятности, в процессе стерилизации глюкозы со средой образуются какие-то продукты, ядовитые для нитрификаторов.

*Л. Осницкая*

# КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

М. Г. Сыромятникова. **Бактериологические исследования в рыбной промышленности.** Издание Тихоокеанского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии. Владивосток, 1949, 112 стр. 32 рис.

Литература по микробиологическому контролю в рыбной промышленности весьма бедна. В специальных периодических журналах иногда опубликовываются статьи, посвященные бактериологическим исследованиям в рыбной промышленности, но они рассматривают лишь отдельные вопросы.

За последние десять лет центральные книгоиздательства не выпустили ни одной книги, отражающей достижения советской науки по технической микробиологии рыбы и рыбных продуктов. Поэтому инициатива Тихоокеанского научно-исследовательского ин-та рыбного хозяйства и океанографии (ТИНРО) должна быть признана своевременной. Однако, поставив перед собой ответственную задачу дать специалистам-бактериологам краткое пособие по бактериологическому контролю в рыбной промышленности, руководители ТИНРО отнеслись к этому изданию недостаточно серьезно.

На страницах нашей печати уже отмечалась недопустимость выпуска научной литературы, в которой авторы занимаются переписыванием материала из чужих трудов (часто дословно) и выдают это за «самостоятельное» произведение.

При внимательном ознакомлении с рецензируемой книгой легко устанавливается, что в отдельных ее разделах имеются многие дословные позаимствования из книг Казакова «Микробиология мяса» и Скородумовой «Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов».

Так, например, подраздел «Уход за микроскопом» (стр. 7) почти полностью взят Сыромятниковой из подраздела «Правила пользования микроскопом» книги Скородумовой. Поэтому т. Сыромятникова механически переписала и совет Скородумовой вытирать переднюю (нижнюю) линзу объектива при ее загрязнении чистой тряпочкой, слегка смоченной водой. Мы считаем более практичным избегать пользоваться водой [1].

Подраздел «Микроскоп и работа с ним» (стр. 5) изложен недостаточно ясно. Желательно было бы также упомянуть о заменителях кедрового масла.

В «Примерный перечень аппаратуры бактериологической лаборатории» Сыромятникова на стр. 108 включила специальную камеру для счета колоний, назвав ее «камерой Вольфюгеля» (вместо Вольфгюгеля). Автор на стр. 36, описывая технику счета колоний, фактически говорит о камере «Вольфгюгеля», но не дает ее точного наименования.

При составлении раздела «Приготовление питательных сред» (стр. 14—26) Сыромятникова не учла унифицированной методики бактериологических исследований, утвержденной Главной Госсанинспекцией СССР (ВГСИ) 12 мая 1943 г. Поэтому в книге отсутствуют ряд питательных сред, рекомендованных ВГСИ.

В подразделе «Количественный анализ по методу культивирования» (стр. 34—40) мы находим значительные позаимствования из книги Скородумовой «Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов» (например, при описании методов Брида и Королева).

Подраздел «Краткое описание некоторых микроорганизмов, имеющих значение при исследовании пищевых продуктов и технологического процесса» (стр. 47—72), не может быть признан полноценным с точки зрения охвата тех групп и видов микробов, которые составляют обыкновенно основной фон микрофлоры рыбы и рыбных товаров или имеют практическое значение как показатели микробного загрязнения или патологического процесса в организме рыбы.

В этом подразделе автор, по нашему мнению, недостаточно четко определил значимость каждого представителя микрофлоры рыб. Поэтому при описании отдельных видов (например, гнилостной микрофлоры) допущена излишняя детализация, а некоторые виды (например, ботулиническая палочка) описаны слишком кратко. Совершенно выпущены ряд патогенных микробов (например, возбудители фурункулеза, краснухи рыб и т. д.), знание которых для бактериолога любого рыбозавода обязательно.

При описании отдельных микроорганизмов т. Сыромятникова использовала в значительной степени сведения, изложенные в книге Казакова «Микробиология мяса» (Пищепромиздат, 1940), причем составительница даже не сочла нужным изменить

[1] Если объектив загрязнен веществами, хорошо растворимыми в воде, то очистка его тряпочкой, смоченной водой, вполне рациональна. *Ред.*

порядок размещения материала, примененный Казаковым. Значительные заимствования материала из книги Казакова «Микробиология мяса» устанавливаются при сличении описания кишечной палочки (стр. 47—49), группы паратифозных бактерий (стр. 49—50) и гнилостных микроорганизмов (стр. 51—58).

Считая, очевидно, книгу Казакова наиболее удобной для своих целей и увлекшись заимствованиями как в части общей архитектоники, так и в отношении максимального использования изложенных в ней сведений, Сыромятникова не нашла целесообразным использовать опубликованные в советской медицинской печати некоторые существенные работы по изучению микрофлоры рыб (например, работы проф. Минкевича, Курочкина, Игнатович, Тарасовой, Чертковой, Шавского и др.). Если бы Сыромятникова ознакомилась хотя бы с последними работами проф. Минкевича по вопросу нахождения кишечной палочки у рыб, то весь материал на эту тему в составленной ею книге выглядел бы совершенно иначе.

Излагая классификацию бактерий (стр. 46), Сыромятникова как бактериолог-пищевик обязана была хотя бы коротко сказать, какие микробы считаются «условно патогенными», и, кроме того, остановиться на стафилококках, считающихся также возбудителями пищевых отравлений.

Несоответствие между значимостью вопроса и отводимым ему местом в книге Сыромятниковой может быть иллюстрировано материалом по вопросу об исследованиях на присутствие ботулинической палочки.

Несмотря на то, что у нас в СССР заболевания ботулизмом носят очень редкий характер, все же детальное ознакомление с этиологией этой инфекции, методикой исследования пищевых продуктов и клинического материала на бациллы ботулизма — является обязательным для каждого бактериолога, работающего в лабораториях рыбной промышленности.

Поэтому никак нельзя считать полноценными и исчерпывающими приведенные Сыромятниковой материалы по описанию ботулинической палочки (стр. 62—63) и технике исследования на присутствие палочки ботулизма (стр. 103—104). Как правило, лабораторная техника должна в таких пособиях быть изложенной в полном соответствии с указаниями Министерства здравоохранения СССР.

Книга не свободна от многих серьезнейших опечаток, из которых далеко не все указаны в приложенном к ней перечне. Так, например: на стр. 24 и 102, вместо метода Шукевича, указано «Щукевича»; на стр. 25, 63, 101, 103 и 104, вместо Китт-Тароцци, пишется «Китта-Тороцци». В табл. 2 на стр. 54 имеются три ошибки в терминологии, а в табл. 11 на стр. 95 — две ошибки. Ряд микроорганизмов неправильно поименован во многих местах (стр. 38, 48, 52, 53, 104). Рисунки имеют подписи из смеси русского шрифта с латинским (например, 24); такая же смесь отмечается в ряде таблиц.

Приведенные неточности терминологического порядка, повторяющиеся во многих местах книги, свидетельствуют о недостаточно серьезном отношении автора и редактора к вопросу обеспечения научной безупречности текста. Недостаточная литературная правка отдельных разделов книги привела к недопустимым ошибкам и курьезам. Так, например, на стр. 72 читаем: «Низкая температура (в холодильниках), повышенное содержание соли (при посоле), недостаточная влажность (копченые балыки, сушеная и вяленая рыба), кислая среда (маринады) — все это угнетает рост бактерий и вместе с тем позволяет развиваться плесеням, которые менее требовательны и более выносливы».

Такая постановка вопроса автором в корне неправильна. По прямому смыслу написанного читатель может сделать вывод, что низкая температура в холодильниках является способствующим фактором для развития плесеней. Как пример небрежной литературной правки можно также привести следующую фразу на стр. 105: «по окончании посевов производят биологическую проверку на присутствие токсино-ботулизма непосредственно в содержимой банке».

Резюмируем наши замечания.

1. Книга, составленная Сыромятниковой, является во многом компиляцией, с недопустимым почти дословным использованием ряда сведений из книг Казакова и Скородумовой.

2. Необходимо издать специальную монографию по бактериологическому контролю в рыбной промышленности, в которой авторский коллектив отразил бы все достижения советской школы микробиологов и гигиенистов.

*Л. М. Крапивнер*

# ХРОНИКА

## СОВЕЩАНИЕ ПО МИКОРИЗЕ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

Совещание по микоризе было созвано по инициативе микоризной комиссии при Институте леса и Научно-технического совета Главного управления полезащитного лесонасаждения.

На совещании, продолжавшемся три дня (с 20 по 22 ноября), приняли участие представители различных научных и учебных учреждений (университетов и научно-исследовательских институтов) Москвы, Ленинграда, Саратова, Киева, Харькова, Воронежа, Брянска. С докладами выступило 17 человек. Совещание имело целью обсудить состояние вопроса по микоризе и на основании материалов опытов, проведенных за период 1949—1950 гг., дать для лесоразведения практические предложения.

Совещание открыл начальник Комплексной полезащитной экспедиции АН СССР Л. Ф. Правдин.

С кратким литературным обзором по вопросам микоризы выступил председатель микоризной комиссии С. И. Ванин. Указав на уже имеющиеся литературные сводки (Лобанов, Новогрудский, Мишустин и Пушкинская), он коснулся лишь работ, появившихся в печати за последние годы. В связи с постановлением партии и правительства о полезащитном лесоразведении вопросы по микоризе привлекли внимание очень многих исследователей во всех концах Советского Союза. Как одну из основных докладчик отметил работу Н. В. Лобанова, проведенную за последние годы в Брянском лесохозяйственном институте.

Докладчик указал на следующие основные направления исследований по микоризе, проводящиеся в настоящее время:

1) изучение географии микотрофных растений;
2) изучение экологии грибов-микоризообразователей и морфологии микоризы;
3) исследования роли микоризы в развитии древесных пород;
4) вопросы, связанные с изучением эффекта искусственного обсеменения почвы микоризными грибами;
5) исследования условий, определяющих оптимальное развитие микоризы;
6) методические вопросы.

Выступавшие далее докладчики в той или иной степени касались указанных выше вопросов.

Из ряда докладов (Лобанов, Мишустин, Зерова, Самцевич, Красовская, Власов, Частухин и др.) по вопросу о географическом распространении микоризных растений выяснилось, насколько широкому обследованию были подвергнуты не только лесные массивы и питомники, но и лесные полосы различного возраста в самых различных почвенных и климатических зонах. Обследования, относящиеся к культуре дуба и сосны, проводились, начиная с северных подзолистых почв и кончая солонцами, каштановыми и светлокаштановыми почвами Юга. Обследовались также пески, песчаные дюны и барханы.

Многочисленными анализами в степной зоне было установлено наличие морфологически различной микоризы как у взрослых деревьев, так и у молодых 2—3-летних сеянцев дуба, высевавшихся без микоризной земли.

Основным выводом из доложенных исследований было, что грибы-микоризообразователи достаточно широко распространены в почвах лесостепных и степных зон. Не было найдено никаких оснований к утверждению, что в степных почвах микориза не развивается. Как указал Мишустин, микоризные ассоциации почв, занятых культурной или дикой травянистой растительностью, могут оказывать тормозящее действие на образование микоризы. Поэтому необходимо выработать соответствующие мероприятия, создающие условия, способствующие наиболее быстрому развитию микоризы в первые годы жизни сеянцев.

Вопрос соотношения интенсивности микоризообразования с ростом дуба также нашел отражение в ряде докладов (Мишустин, Власов, Красовская, Лобанов и др.). На основании полученных материалов возможно было придти к выводу, что наилучшее развитие микоризы почти без исключения отмечается у хорошо развивающихся сеянцев. Эти данные не решают окончательно вопроса о необходимости микоризы для сеянцев ряда растений. К разрешению последнего вопроса подошли докладчики, представившие материалы о физиологической роли микориз (Худяков, Купревич, Гельцер). Хотя этот раздел исследований является, как отмечали многие докладчики, наименее разработанным, доложенные материалы свидетельствуют, что

гриб, используя для себя углеводы растения, может одновременно служить для последнего передатчиком воды. Вместе с водой микоризные растения поглощают и питательные вещества. Данные, представленные Гельцер, говорят о большем накоплении зольных элементов у микоризных растений по сравнению с немикоризными.

По утверждению Худякова, гриб, распространяясь на далекие расстояния от корня, значительно увеличивает площадь питания растения. Вода и растворенные в ней питательные вещества проходят по грибу как по каналу.

Купревич показал, что гриб, поселяясь на корнях дуба, не перестает быть гетеротрофом. Набор ферментов у гриба, поселяющегося в корне остается тем же, что и у гриба, живущего вне связи с корнем. Отмечается только более высокая активность ферментов в микоризных корнях. На основании полученных материалов докладчик приходит к выводу, что заселение грибом корня придает некоторые черты гетеротрофности автотрофному растения.

Несколько докладов (Лобанов, Частухин, Красовская, Власов) были посвящены морфологии микоризы.

Наиболее дискуссионным оказался вопрос о роли и способах микоризации почвы. Материалы большинства докладчиков показали, что микоризация оказывает большое влияние на выживаемость сеянцев, что очень важно в первый год их жизни. Имеются данные и в отношении лучшего заражения микоризным грибом и лучшего роста сеянцев дуба в результате микоризации.

В своих докладах Красовская и Шемаханова касались вопроса о значении длительности и условий хранения микоризной земли. Возняковская и Частухин поставили вопрос о возможности применения чистых культур микоризных грибов и спор грибов в целях микоризации.

Гельцер доложила о положительной роли микоризных питомников.

Как отметил С. И. Ванин и другие участники совещания, еще многие вопросы затронутой проблемы не нашли разъяснения. Еще не установлены точные показатели положительного влияния микоризы, еще не имеется единых методов определения степени микоризации; еще не доказана возможность замены микоризной земли из-под дуба землей из-под других лесонасаждений и т. д.

Несколько докладов (Гельцер, Лобанов, Пушкинская, Самцевич, Красовская и др.) коснулись вопроса приживаемости микоризных грибов в разных почвах.

Наметились два основных условия, необходимых для того, чтобы внесение микоризной земли дало положительный эффект,— это влажность и удобрение.

Как показали материалы докладов, орошение имеет колоссальное значение. В условиях сухих степей развитие микоризы идет крайне медленно. Как показали вегетационные опыты (Красовская, Самцевич), при влажности почвы в 20 и 80% микориза не образовывалась. Лучше всего микоризообразование отмечалось при содержании влаги в 40—60%. Наиболее ярко отрицательное влияние дефицита влаги в почве выявилось в опытах с покровными культурами и особенно с колосовыми. Пропашные культуры обеспечивали лучшее образование микоризы. Отмечалось благоприятное влияние и мульчирования.

Опыты с внесением удобрений как по микоризному, так и по безмикоризному фону показали, что удобрения являются одним из ведущих факторов хорошего роста сеянцев и развития микоризы. Действие удобрений следует расценивать не только как улучшение питания гриба и растения, но и как способ снятия токсичности почвы по отношению к микоризным грибам. Наилучший эффект был получен при добавлении суперфосфата и азотистых удобрений.

Все доложенные материалы после обсуждения были переданы специальной комиссии для окончательных выводов и составления доклада для Главного управления полезащитного лесонасаждения.

*О. Пушкинская*

# СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

Г. А. Медведева. Роль витамина $B_1$ и пара-аминобензойной кислоты в жизнедеятельности Rhodotorula aurantiaca . . . . . 305
Г. И. Мосиашвили. К характеристике шероховатых и гладких форм некоторых штаммов винных дрожжей . . . . . 314
В. О. Калиненко. Бактерии и морские беспозвоночные животные . . . . . 320
В. А. Экзерцев. Микроскопические исследования бактериальной флоры в нефтеносных фациях Второго Баку . . . . . 324
Г. Н. Блинков. Рост азотобактера и азотфиксация в условиях кислой и щелочной среды . . . . . 330
Н. И. Гамова-Каюкова. Дифференциальная среда для выделения стафилококков из пищевых продуктов . . . . . 337
М. И. Гольдин и М. З. Назарова. Реакция Cyphomandra betacea на вирус мозаики табака и стрика . . . . . 340
Л. А. Потков. Прибор для двойной мембранной ультрафильтрации . . . . . 343
К. И. Рудаков. Нитрагин (Обзор за 1944—1950 гг.) . . . . . 348
В. М. Богданов. О принципах селекции микроорганизмов . . . . . 363
К. В. Косиков. Методы гибридизации и направленной изменчивости в селекции дрожжевых культур . . . . . 365
С. С. Лещинская. О принципах селекции микроорганизмов . . . . . 378
Л. Г. Логинова. О первых работах по приспособлению микроорганизмов . . 380
Рефераты . . . . . 383
Критика и библиография . . . . . 389
Хроника . . . . . 391

Т-05026 Подписано к печати 20/VII 1951 г. Печ. л. 7,53+1 вкл.
Уч.-изд. л. 8,8. Формат бум. 70×108¹/₁₆. Бум. л. 2³/₄. Тираж 5300 экз. Заказ 1212

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10

**Цена 9 руб.**

## К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

Статьи, представляемые в редакцию, должны быть тщательно отредактированы в рукописи. Сообщаемые в статье результаты экспериментальных исследований должны быть изложены кратко и ясно, а в конце статьи должны быть выводы. Никакие исправления в корректуре против рукописи не допускаются.

Рукопись, в том числе и литература, должна быть четко переписана на машинке на одной стороне листа писчей бумаги с двумя интервалами. Объем представляемых работ, включая таблицы и литературу, не должен превышать 14—15 страниц, перепечатанных на машинке. С левой стороны листа должны быть оставлены чистые поля (3—4 см). В редакцию посылается первый, перепечатанный на машинке, экземпляр. Страницы рукописи должны быть перенумерованы единой нумерацией, включая основной текст, таблицы, литературу и т. д. Обозначение за одним номером нескольких страниц (например 21а, 21б) не допускается. В конце рукописи обязательно должны быть собственноручная подпись автора, название учреждения, где выполнена работа, и точный его адрес.

Таблицы должны находиться в соответствующих местах рукописи и в тексте на них должны быть ссылки. Подзаголовки таблиц должны быть краткими, но их необходимо писать полностью, без сокращений.

Количество иллюстраций должно быть минимальным, они должны быть совершенно отчетливыми и выполнены тушью на белой бумаге или на кальке. На полях рукописи указывается место рисунка, а в тексте на него дается ссылка. Фотографии печатаются только при абсолютной их необходимости, причем они должны быть контрастными и в черных тонах. На микрофотографиях должно быть указано увеличение, при котором произведен снимок.

На обороте каждого рисунка должны быть написаны простым карандашом: фамилия автора, заглавие статьи, номер рисунка и страница рукописи, к которой он относится. Подписи к иллюстрациям даются на особом листе с указанием номеров рисунков.

Статья должна содержать результаты собственных исследований автора и поэтому в ней разрешается приводить только очень краткие ссылки на литературу.

Приводить названия цитируемых работ в тексте статьи или в сносках нельзя. Вся литература должна быть сведена в особый список, помещаемый в конце статьи. Перечень литературы приводится в алфавитном порядке авторов и нумеруется; для русских и иностранных работ составляются самостоятельные алфавитные списки. Ссылаться на неопубликованные в печати работы и устные сообщения не разрешается.

Отдельные работы одного и того же автора располагаются в хронологической последовательности; в случае наличия у автора нескольких работ, изданных в одном году, они нумеруются строчными буквами алфавита (напр. 1927a; 1927b, 1927c).

В списках литературы должны даваться следующие данные: а) фамилия, б) инициалы, в) название работы, г) сокращенное общепринятое название журнала (для книги — место издания), д) том, страница и год.

Фамилии иностранных авторов при цитировании в статье в первый раз даются как на русском, так и на иностранном языке, а при дальнейших ссылках только на русском языке. Одновременно с фамилией цитируемого автора в скобках указывается его порядковый номер по списку литературы. Помещение в списке литературы всех цитируемых в статье работ — обязательно. Приводить в списке литературы работы, не упоминаемые в тексте, не разрешается.

Сокращение слов, имен, названий, как правило, не допускается. Разрешаются лишь общепринятые сокращения — различных мер, физических, химических и математических величин и терминов и т. п. Все меры должны даваться в метрической системе, а температура по шкале Цельсия.

Рукописи, оформленные без соблюдения настоящей инструкции, будут возвращаться авторам для исправления.

Если автор в связи с вносимыми исправлениями задержит рукопись свыше одного месяца, статья будет считаться в дальнейшем как поступившая вновь.

*Редакция.*